

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

Rogério Santos Pereira

**Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre  
a bioconversão de xilose em xilitol**

Lorena  
2007

Rogério Santos Pereira

**Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre  
a bioconversão de xilose em xilitol**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de concentração: Conversão de biomassa.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Inês Conceição Roberto

Lorena  
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### Catálogo na Publicação

Pereira, Rogério Santos

Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol / Rogério Santos Pereira ; orientadora Inês Conceição Roberto . -- 2007

100 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Biotecnologia 2. *Cândida guilliermondii* 3. Ácido acético 4. Siringaldeído 5. Ácido ferúlico 6. Xilose 7. Xilitol. I. Título.

## DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO

*Aos meus pais (José e Waldomira), pela luta e a determinação, mesmo com todas as adversidades da vida hoje são vencedores, e me fizeram acreditar na vitória que motiva hoje e sempre, à nunca desistir.*

*A Tânia pelo amor, paciência, compreensão e dedicação durante o período para a realização desta fase da minha vida.*

*Aos meus irmãos (Reginaldo, Reinaldo e Ronaldo) pela confiança e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as alegrias e tristezas que de forma indiscutível me auxiliaram na execução desta dissertação.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Inês Conceição Roberto, pela idéia inicial deste trabalho, pela orientação, pelos conselhos, repreensões, e pela confiança durante a realização deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos os professores, funcionários e alunos do laboratório e do Departamento de Biotecnologia, que direta e indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

A meus pais Waldomira e José, Irmãos Reginaldo, Reinaldo e Ronaldo, pelo incentivo e confiança.

A Tânia pelo amor, confiança, sugestões e incentivos constantes.

Aos amigos do laboratório: João, Priscila, Tais, Daniela C., Solange, Francislene, Daniela B., Marcela, Rodrigo, Lílian, Nicanor e Paulinho.

## RESUMO

PEREIRA, R. S. **Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol.** 2007. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

O acúmulo e destino inapropriados dos resíduos agroindustriais contribuem para o aumento da poluição global e, consigo, trazem problemas não só ambientais, mas também para a saúde humana e suas implicações. O xilitol, um açúcar álcool com propriedades médicas, pode ser produzido a partir da bioconversão da xilose presente na hemicelulose de resíduos agrícolas como a palha de arroz. Contudo, durante o processo de hidrólise, que visa à liberação da xilose do material lignocelulósico, também são liberados compostos tóxicos que podem afetar o metabolismo microbiano promovendo alterações no processo de bioconversão de xilose em xilitol. Tendo em vista a necessidade de conhecer o comportamento fermentativo de uma espécie produtora de xilitol frente a alguns compostos tóxicos normalmente solubilizados durante a hidrólise ácida, da fração hemicelulósica da palha de arroz, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii*. Foram também avaliados, através de um planejamento experimental, os possíveis efeitos de interação entre estes compostos, empregando-se meios definidos tamponados e não tamponados. Os resultados revelaram que para os três compostos avaliados, individualmente, a inibição sobre o crescimento celular foi muito mais acentuada do que sobre os parâmetros fermentativos da biossíntese de xilitol. Para todas as combinações dos compostos avaliadas, no planejamento experimental, o tamponamento do meio de fermentação favoreceu os parâmetros fermentativos e não foi observado qualquer efeito de interação entre os compostos. Em meios tamponados, o siringaldeído não apresentou efeito significativo sobre os parâmetros fermentativos avaliados. Nestes meios, o ácido acético e o ácido ferúlico apresentaram efeito negativo sobre a produtividade volumétrica em xilitol, sendo mais pronunciado pelo ácido acético do que pelo ácido ferúlico. Em meios não tamponados, o ácido ferúlico não apresentou efeito significativo sobre os parâmetros fermentativos avaliados. Nestes meios, o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), foram influenciados negativamente pelo ácido acético e positivamente pelo siringaldeído, ou seja o efeito negativo do ácido acético foi anulado pela presença de siringaldeído no meio de fermentação. Ensaios fermentativos em hidrolisado de palha de arroz, revelaram que os compostos selecionados são representativos da inibição da bioconversão de xilose em xilitol, por *C. guilliermondii* e que o processo de destoxificação para remoção dos inibidores, é necessário para melhorar a fermentabilidade do hidrolisado. Quando o hidrolisado foi suplementado com os inibidores, os valores de  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  foram reduzidos de 0,72 g/g para 0,51 g/g e de 0,49 g/L.h para 0,33 g/L.h, respectivamente, após 96 h de fermentação. Comportamento semelhante foi também observado no meio definido que apresentou redução de 38% nos valores dos parâmetros fermentativos, após 96 h, quando o meio foi suplementado com os compostos inibidores.

**Palavras-chave:** *Candida guilliermondii*, Ácido acético, Ácido ferúlico. Siringaldeído, Xilose e Xilitol.

## ABSTRACT

PEREIRA, R.S. **Effect of the acetic and ferulic acids and syringaldehyde on the xylose into xylitol bioconversion.** 2007. 100f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology), School of Engineering of Lorena, University of São Paulo, Lorena, São Paulo.

The improper accumulation and destination of the agro-industrial residues contribute for the increase of global pollution and, generate problems not only for environment, but also for health human and its implications. Xylitol, a sugar alcohol with medical properties, can be obtained from bioconversion of hemicelulosic fraction of lignocelulosic materials containing xylose, like the rice straw. However, during the hydrolysis process, which releases xylose from the lignocelulosic material, toxic compounds are also released, affecting the microbial metabolism and promoting alterations on the xylose into xylitol bioconversion. The knowledge of the fermentative behavior of a xylitol-producer specie against some toxic compounds, normally solubilized during the acid hydrolysis of the rice straw hemicelulosic fraction is the fundamental importance. Thereafter, this work aiming to study the effect of the acetic and ferulic acids and syringaldehyde on the xylose into xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii* yeast. The possible effects of interaction between these compounds were also evaluated using an experimental design employing defined media (buffered or unbuffered). The results showed that for these three compounds evaluated, individually, the cellular growth inhibition was higher than xylitol biosynthesis parameters. For all the compounds combinations evaluated in the experimental design, the fermentative parameters were improved in the buffered medium and no interaction effect between the compounds was observed. In the buffered media, syringaldehyde did not present significant effects on the evaluated fermentative parameters. In these media, the acetic and the ferulic acids presented negative effect on the xylitol volumetric productivity ( $Q_P$ ), since acetic acid had more pronounced effects in relation to the ferulic acid. In the unbuffered media, the ferulic acid did not present significant effect on the evaluated fermentative parameters. In these media, the yield factor ( $Y_{P/S}$ ) and the xylitol volumetric productivity ( $Q_P$ ), were influenced negatively by the acetic acid and positively by syringaldehyde, in other words, the acetic acid negative effect was annulled by the presence of syringaldehyde in the fermentation medium. Fermentative assays in rice straw hydrolysates showed that these selected compounds are representative in the inhibition of the xylose into xylitol bioconversion by *C. guilliermondii*. The detoxification process for the inhibitors removal is necessary to improve the hydrolysate fermentability. When the hydrolysate was supplemented with inhibitors, the values of  $Y_{P/S}$  and  $Q_P$  were reduced from 0.72 g/g to 0.51 g/g and from 0.49 g/L.h to 0.33 g/L.h, respectively, after 96 h fermentation. Similar behavior also was observed in the defined medium, which presented reduction of 38% in the values of the fermentative parameters after 96 h, when the medium was supplemented with inhibitory compounds.

**Key-words:** *Candida guilliermondii*, Acetic acid, Ferulic acid, Syringaldehyde, Xylose and Xylitol.

## LISTAS DE ABREVIATURAS

$\eta$	<b>Eficiência de Conversão</b>
AA	<b>Ácido Acético</b>
ADP	<b>Adenosina Difosfato</b>
AF	<b>Ácido Ferúlico</b>
ATP	<b>Adenosina Trifosfato</b>
BHI	<b>Infusão de Cérebro e Coração</b>
CLAE	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b>
$C_{Xl}$	<b>Consumo de Xilose</b>
DEBIQ	<b>Departamento de Biotecnologia</b>
DO	<b>Densidade Ótica</b>
EEL	<b>Escola de Engenharia de Lorena</b>
FDA	<b>Food and Drug Administration</b>
GMBio	<b>Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos</b>
HDC	<b>Hidrolisado Destoxificado e Concentrado</b>
HHEM	<b>Hidrolisado Hemicelulósico de Espiga de Milho</b>
HHPA	<b>Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz</b>
HMF	<b>5-hidroximetilfurfural</b>
HNDC	<b>Hidrolisado Não Destoxificado e Concentrado</b>
IBGE	<b>Instituto Brasileiro de Geografia Estatística</b>
MD	<b>Meio Definido</b>
NAD	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Oxidado</b>
NAD(P)	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato Oxidado</b>
NAD(P)H	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato Reduzido</b>
NADH	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Reduzido</b>
Nd	<b>Não detectado</b>
OMA	<b>Otite Média Aguda</b>
$P_f$	<b>Concentração Final de Xilitol</b>
$P_i$	<b>Concentração Inicial de Xilitol</b>
$P_{XO}$	<b>Concentração de Xilitol</b>
$Q_P$	<b>Produtividade Volumétrica em Xilitol</b>
$S_{1f}$	<b>Concentração Final de Glicose</b>

$S_{1i}$	<b>Concentração Inicial de Glicose</b>
$S_{2f}$	<b>Concentração Final de Xilose</b>
$S_{2i}$	<b>Concentração Inicial de Xilose</b>
SI	<b>Siringaldeído</b>
$t_f$	<b>Tempo Final da Fermentação</b>
$t_i$	<b>Tempo Inicial da Fermentação</b>
USP	<b>Universidade de São Paulo</b>
$V_0$	<b>Valor Real da Variável Independente no Ponto Central</b>
$V_C$	<b>Valor Codificado da Variável Independente</b>
$V_R$	<b>Valor Real da Variável Independente</b>
X	<b>Concentração Celular</b>
$X_f$	<b>Concentração Final de Células</b>
$X_i$	<b>Concentração Inicial de Células</b>
$Y_{P/S}$	<b>Fator de Conversão de Xilose em Xilitol</b>
$Y_{X/S}$	<b>Fator de Conversão de Substrato em Células</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1. Xilitol.....	13
2.2. Materiais Lignocelulósicos.....	19
2.3. gênero <i>Candida</i> como modelo para o Metabolismo da D-xilose .....	24
2.3. Ação de Inibidores Presentes no Hidrolisado.....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1. Microrganismo .....	35
4.2. Preparo do inóculo .....	35
4.3. Efeito do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído na Bioconversão de Xilose em Xilitol em Meio Definido .....	36
4.4. Efeito do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído na Bioconversão de Xilose em Xilitol, em Meio Definido, Empregando a Metodologia do Planejamento Experimental .....	37
4.5. Efeito do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído na Bioconversão de Xilose em Xilitol em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz.....	39
4.5.1. Obtenção e Tratamento do Hidrolisado.....	39
4.5.2. Meio de Fermentação.....	39
4.5.3. Condições de Fermentação .....	40
4.6. Métodos Analíticos .....	40
4.6.1. Determinação da Concentração Celular.....	40
4.6.2. Determinação do pH.....	41
4.6.3. Determinação da Concentração de Açúcares e de Produtos da Fermentação .....	41
4.6.4. Determinação da Concentração de Compostos Fenólicos.....	41
4.7. Metodologia de Análise dos Resultados .....	42
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>83</b>

APÊNDICE A. Curvas de Calibração .....	83
APÊNDICE B. Resultado do Efeito do Ácido Acético; Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre o Crescimento e a Produção de Xilitol por <i>C. guilliermondii</i> em Meio Definido .....	86
APÊNDICE C. Resultado da Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando a Metodologia do Planejamento Experimental Com Tamponamento.....	91
APÊNDICE D. Resultado da Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando a Metodologia do Planejamento Experimental Sem Tamponamento. ....	95
APÊNDICE E. Resultado da Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando o Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz.....	99

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o uso desordenado dos recursos ambientais bem como o avanço tecnológico dos diversos setores que compõe a economia, têm chamado a atenção no que diz respeito à preservação ambiental, resultando na busca de formas eficientes de aproveitamento dos resíduos provenientes dos processos industriais. Neste contexto estão inseridos os materiais lignocelulósicos que podem ser encontrados sob a forma de resíduos agrícolas e florestais.

A alta proporção de pentoses, particularmente xilose, na fração hemicelulósica de vários resíduos agro-industriais, aliada à sua maior facilidade de extração do complexo lignocelulósico, têm atraído a atenção de pesquisadores para a efetiva utilização desta fração em processos de bioconversão. Atualmente, pesquisas relacionadas com a obtenção de xilitol e etanol, por via biotecnológica, à partir de fontes lignocelulósicas têm se intensificado, devido à expansão do mercado de polióis no mundo e o grande interesse na produção dos mesmos.

O uso do xilitol, em produtos industrializados, é aprovado em mais de quarenta países, é utilizado pelas indústrias de alimentos, de fármacos e as de cosméticos. Na Escandinávia e em outras partes da Europa, este poliol vem sendo amplamente utilizado nesses três setores industriais há mais de 20 anos.

No Brasil, o interesse das indústrias pela inclusão do xilitol na formulação de produtos alimentícios, se deve ao seu efeito refrescante e, sobretudo, pela sua ação anticariogênica. Recentes pesquisas com animais e humanos demonstram que o xilitol, além de poder ser utilizado como um ingrediente alimentar, possui várias aplicações clínicas, sendo indicado para prevenir doenças relacionadas à hipossalivação, formação de placa dental e otite. Assim, é de grande interesse a realização de pesquisas científicas que contribuam para o desenvolvimento de tecnologia para produção de xilitol por via biotecnológica, criando desta forma, uma alternativa de produção deste poliol em alta escala: competitiva ao processo por via química e que gere menor impacto ambiental.

Dentro deste contexto, a rota biotecnológica torna-se ainda mais atraente, devido à especificidade das enzimas envolvidas no catabolismo de xilose, o que proporciona altos rendimentos e maior facilidade de separação do xilitol.

Durante a hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos, visando à obtenção de xilose, diferentes tipos de açúcares e produtos de degradação são formados. Os

produtos formados considerados como inibidores ao metabolismo microbiano incluem ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido p-hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido ferúlico, siringaldeído, vanilina, entre outros. Por esse motivo, o conhecimento da concentração inibitória destes compostos e, como minimizar os seus efeitos é de extrema importância para alcançar processos fermentativos eficientes.

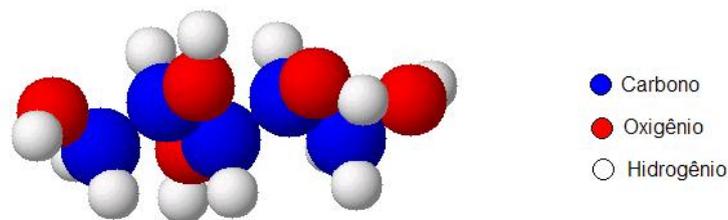
O aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa vegetal para obtenção de produtos de interesse industrial, constitui uma das principais linhas de pesquisa conduzidas pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP). Visando contribuir para o desenvolvimento destas pesquisas e dando continuidade ao estudo da obtenção de xilitol por fermentação, o presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos dos compostos: ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído, normalmente solubilizados durante a hidrólise ácida, na fração hemicelulósica da palha de arroz, sobre da metabolismo *Candida guilliermondii* durante a bioconversão de xilose em xilitol.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Xilitol

Em setembro de 1890, o professor de química alemão Emil Herman Fischer e seu assistente, Rudolf Stahel, isolaram um novo composto nomeado de xilitol, a partir de casca de uma árvore da família *Fagaceae* (MÄKINEN, 2000 a). Após cinco décadas, durante a 2ª grande guerra mundial, este composto se tornou de grande interesse devido a sua propriedade adoçante sendo uma alternativa para a falta de açúcar (GASTRÖM, 2002). Em meados 1950 o grupo de pesquisa do Dr. Oscar Touster, concluiu que o xilitol é produzido no organismo humano podendo ser excretado na urina em situações patológicas (MÄKINEN, 2000 a).

O xilitol é um poliálcool natural de cinco átomos de carbono e de fórmula  $C_5H_{12}O_5$  (conforme demonstrado na Figura 2.1) (OOI; LE; MARKUSZEWSKI 2002). Apresenta estrutura molecular aberta com cinco grupos OH, sendo que cada grupo se liga a um átomo de carbono, então conhecido como pentinol ou polihidroxiálcool acíclico (MÄKINEN, 2000 b).



**Figura 2.1.** Forma estrutural do xilitol (software ACD/3D Advanced Chemistry Development Inc. Versão 4.52/10 abril 2000)

O xilitol tem aparência cristalina e branca semelhante à sacarose, massa molar 152,15 g/mol, sendo altamente solúvel em água, 64,2 g/100 g de  $H_2O$ , e se mantendo estável sob prolongado aquecimento (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973). Além do poder adoçante, estas propriedades físico-químicas e fisiológicas colocam este poliálcool como produto em potencial para aplicações em diversos setores industriais de alimentos, fármacos e cosméticos (LIMA *et al.*, 2004).

Características organolépticas de refrescância, dão a este poliol, vantagens na sua inclusão em certos produtos alimentares, especialmente gomas de mascar, balas e chocolates (PEPPER; OLINGER, 1988). Tal propriedade se deve ao elevado calor de solução endotérmico (-34,8 cal/g) sentido quando o xilitol entra em contato com a saliva (MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003).

Um efeito indesejado observado com a utilização do xilitol em alimentos, deve-se às suas propriedades laxativas quando consumido em grandes quantidades. Entretanto, este efeito colateral é transitório, e em menor grau e frequência que aqueles promovidos pelo uso do sorbitol ou manitol, cessando quando suspenso o uso (MÄKINEN, 2000 b).

Scheinin *et al.* (1975) relataram que entre 52 indivíduos adultos, que consumiram 50 g de xilitol por dia, apenas um indivíduo apresentou um desconforto intestinal. Segundo os autores Maguire e Rugg-Gunn (2003) na Suíça e Finlândia há um elevado consumo de xilitol por crianças, contudo o desconforto intestinal não parece ser um problema.

### **2.1.1. Aplicações do Xilitol**

O uso de gomas de mascar contendo este poliálcool é de grande importância para o tratamento de doenças causadas ou agravadas pela hipossalivação (SCALLY; FELIX, 2005). Na saúde bucal, o xilitol promove mudanças na composição da saliva causando um aumento no fluxo salivar (EDGAR, 1998).

Os pesquisadores Uhari, Kontiokari e Niemelä (1998) estudaram durante 3 meses 857 crianças saudáveis de creches na cidade Oulu, Finlândia. As crianças participantes do trabalho foram randomizadas em 5 grupos de tratamento, em que, um grupo recebia xarope com xilitol (159 crianças), outro goma de mascar de xilitol (179 crianças) e balas de xilitol (176 crianças), e dois grupos controle para o xarope (165 crianças) e para goma de mascar (178 crianças). A dose diária de xilitol variou de 8,4 g (gomas de mascar) a 10 g (xarope). O principal resultado analisado no planejamento foi a ocorrência de otites médias agudas (OMA), cada vez que a criança mostrou qualquer sintoma de infecção respiratória. Os resultados demonstraram que apenas 26% das 159 crianças que receberam o xarope com xilitol foram afetadas pela OMA, demonstrando uma redução de 30% das infecções

respiratórias quando comparado ao controle. A ocorrência de otites diminuiu em 40% nas crianças que receberam gomas de mascar com xilitol e em 20% dos que receberam balas, comparados ao controle. Os autores concluíram que o consumo de xilitol, na forma de xarope e goma de mascar, além de bem tolerado, foi eficaz na prevenção de OMA e diminuiu a necessidade de uso de antibióticos.

Em estudos da avaliação da ocorrência de mudanças no aspecto morfológico da parede celular de *Streptococcus pneumoniae*, Tapiainen *et al.* (2004) realizaram experimentos com a exposição de 5 cepas desta espécie ao xilitol. Estes autores cultivaram o microrganismo em meios nos quais variaram a concentração de xilitol de 0,5% a 5% de xilitol adicionados de 5% de glicose, 5% de frutose e empregaram como controle meio comercial BHI (infusão de cérebro e coração). Análises por micrografia eletrônica foram realizadas após 30 minutos e 2 horas de exposição das cepas às diferentes concentrações de xilitol. Os resultados obtidos demonstraram que a parede celular do *pneumococci* se tornou mais difusa com o aumento do tempo de exposição ao xilitol mesmo nas menores concentrações. Desta forma, os autores relacionaram as mudanças na cápsula de polissacarídeo e na parede celular dos *pneumococci* com a diminuição da aderência e virulência desta espécie.

Como um produto intermediário durante o metabolismo de carboidratos em mamíferos, o xilitol se apresenta no sangue em concentração normal 0,03 a 0,06 mg/ 100 ml (PEPPER; OLINGER, 1998), sendo um açúcar com propriedades para o tratamento de pacientes diabéticos e obesos (LIMA *et al.*, 2004).

Natah *et al.*, (1997) realizaram estudos com o objetivo de analisar a concentração de glicose, insulina e C-peptidase no plasma após a ingestão de 25 g de lactitol, xilitol ou glicose, por 8 homens saudáveis, não obesos, depois de uma noite em jejum. Os resultados indicaram que o aumento nas concentrações de glicose no plasma sanguíneo, insulina e C-peptidase após ingerir lactitol ou xilitol foram inferiores ao verificado após a ingestão de glicose. Desta forma os autores concluíram que o lactitol ou xilitol são adequados para a inclusão na dieta de diabéticos.

Segundo Mäkinen (2000a) os benefícios do xilitol começaram a ser pesquisados em 1970 e têm se aprofundado durante as últimas décadas, devido à constatação dos efeitos deste poliol sobre a formação de placa bacteriana. Pesquisas revelam que a ingestão diária de doces e bebidas contendo xilitol, reduz em média 48% na formação de placa, comparado ao uso de glicose e sacarose. De

acordo com Mäkinen (1979), vários fatores contribuem para ação anticariogênica do xilitol, e entre estes se incluem a não fermentabilidade deste poliol por bactérias do gênero *Streptococcus*, pertencentes à microbiota normal da boca.

Pesquisas clínicas e microbiológicas de substituição parcial da sacarose utilizando concentrações de xilitol próximas a 10 g por dia demonstraram uma diminuição no nível de estreptococos do grupo *mutans* na saliva e na placa bacteriana, além de redução na quantidade de placa (SÖDERLING *et al.*, 2000).

Gonçalves, Junior e Salvador (2001) realizaram pesquisas com o objetivo de avaliar o efeito de soluções de fluoreto de sódio a 0,05% contendo 2,5% ou 12,5% de xilitol, no número de estreptococos do grupo *mutans* presentes na saliva. Estes autores fizeram um estudo duplo cego, do tipo cruzado, com um total de 50 meninos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, empregando as seguintes soluções: solução placebo; solução de fluoreto de sódio a 0,05%; solução de fluoreto de sódio a 0,05% + 2,5% xilitol + 2% sorbitol; solução de fluoreto de sódio a 0,05% + 12,5% xilitol + 2% sorbitol. Os indivíduos utilizaram 20 mL de uma das soluções, duas vezes ao dia, por um período experimental de 28 dias. Os resultados obtidos demonstraram que a maior redução na concentração de *Streptococcus mutans* foi obtida com a adição de xilitol na solução.

Os carboidratos são utilizados como fonte de energia por bactérias que empregam complexos enzimáticos tais como o sistema frutose-fosfotransferase. Entretanto, algumas bactérias, como por exemplo, *Streptococcus mutans*, não são capazes de metabolizar o xilitol, provavelmente devido à falta de enzimas responsáveis para o metabolismo do xilitol-5-fosfato formado durante o transporte de xilitol via sistema fosfotransferase. (TRAHAN; NÉRON; BAREIL 1988). De acordo com os autores, ocorre um gasto energético devido ao transporte e o acúmulo deste composto torna-se tóxico para a células.

Em estudos realizados por Mäkinen (1979) em voluntários que substituíram o uso do açúcar por xilitol, foi observado um aumento dos níveis dos íons cálcio e potássio durante e após o consumo de xilitol, o aumento do fluxo salivar e a manutenção do pH entre 7,2 e 7,8, decorrentes da dieta a que foram submetidos.

A grande aplicabilidade do xilitol na indústria torna este composto de grande valor comercial. Segundo Bar (1991), este poliol vem sendo utilizado em vários países na manufatura de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos no mercado Europeu e Escandinávia, há mais de 20 anos. Em função do alto preço,

este produto tem sido normalmente misturado a outros adoçantes, atuando como agente de corpo (MÄKINEN *et al.*, 1998).

### 2.1.2. Produção de Xilitol

O xilitol é facilmente encontrado na natureza, em várias fontes como: frutas, vegetais e cogumelos. Entretanto, as concentrações são inferiores a 900 mg/100 g, tornando sua extração antieconômica e impraticável (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998 a).

A obtenção de xilitol pode ser feita por processo químico, através da hidrogenação da xilose presente na matéria vegetal, e empregando esta tecnologia, a produção de xilitol em escala industrial teve início em 1975 na Finlândia. O processo baseia-se na utilização de madeira de pequeno porte, árvores de troncos finos, com as quais a indústria tem capacidade para produzir cerca de 4.000 ton/ano (MELAJA; HÄMÄLÄINEM, 1977). Entretanto, este processo emprega xilose pura, a qual é reduzida quimicamente, o que requer severos passos de purificação da xilose (GASTRÖM, 2002) devido à elevada sensibilidade dos catalisadores empregados na reação. Além disso, a pureza final da solução de xilitol é dependente da separação dos subprodutos originários da reação de redução, refletindo na elevação dos custos de produção xilitol (HEIKKLÄ *et al.*, 1992). De acordo com Parajó, Dominguez e Dominguez (1998b) os custos associados ao processo químico cerca de 10 vezes superiores aos da produção de sacarose ou de sorbitol.

Biologicamente, é possível fazer a conversão de xilose em xilitol utilizando os hidrolisados oriundos da fração hemicelulósica da biomassa vegetal (FELIPE *et al.*, 1997a; ROBERTO; SATO; MANCILHA 1996) empregando microrganismos ou enzimas específicas, que atuam somente na conversão de xilose em xilitol. Desta forma, a etapa de purificação inicial da xilose é eliminada, garantindo maior rendimento do produto e, conseqüentemente, facilitando a sua separação (GIMENES, CARLOS; PEREIRA Jr, 2000). Apesar de todas essas vantagens, a obtenção de xilitol por via biotecnológica está associada à capacidade dos microrganismos de sintetizar a enzima xilose redutase (XR), que catalisa a redução de xilose a xilitol com a participação dos cofatores NADPH ou NADH (ROSEIRO *et al.*, 1991).

As vantagens do processo microbiológico incluem as condições de formação do produto em temperatura e pressão amenas, o que conseqüentemente, gera um menor custo energético, resultando num produto mais barato (SAMPAIO *et al.*, 2003).

O xilitol, composto relativamente estável, ou é excretado da célula, ou é oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), cuja atividade requer os cofatores NAD ou NADP. Em resumo, a produção de xilitol depende de uma elevada atividade da enzima XR ou uma baixa atividade da enzima XDH, sendo o grau de atividade dessa enzima o critério utilizado para identificar os melhores produtores (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Embora leveduras sejam mais aptas que bactérias e fungos para produzir xilitol, é difícil classificar suas várias espécies quanto à capacidade produtiva. Não obstante, há autores que afirmam que as que têm maior potencial pertencem ao gênero *Candida* (MAYERHOFF *et al.*, 1996; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Atualmente, há muitos estudos sobre a bioconversão de xilose em xilitol por leveduras, à partir de hidrolisados oriundos da fração hemicelulósica da biomassa vegetal. Com vistas à otimização desses processos, diversos pesquisadores tentam estabelecer as melhores condições de cultivo de leveduras, avaliando o efeito de diferentes variáveis, como por exemplo: pH (CANNETTIERI; ALMEIDA-SILVA; FELIPE., 2001; FELIPE *et al.*, 1999; ROBERTO *et al.*,1996;), temperatura (BARBOSA *et al.*, 1988; CONVERT; PEREGO; DOMÍNGUEZ, 1999), oxigênio dissolvido (MORITA; SILVA; FELIPE 2000; ROBERTO; MANCILHA; SATO 1999), concentração inicial de substrato (FELIPE *et al.*, 1993; SILVA; ROBERTO, 1999), fonte de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 1988; ROBERTO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1994;), concentração inicial celular (CORTEZ, 2005; SILVA; ROBERTO, 1999), presença de outros açúcares (FELIPE *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1996) e presença de inibidores (ALVES *et al.*, 1998; CORTEZ, 2005; MUSSATTO; ROBERTO, 2001; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 a; ROBERTO *et al.*, 1991).

## 2.2. Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos sob a forma de resíduos agrícolas e florestais são acumulados anualmente, no mundo, em grandes quantidades. Devido a sua natureza renovável e ao seu baixo custo, estes materiais têm sido amplamente utilizados como matéria prima para geração de energia, ração animal e principalmente como fonte de carboidratos para processos de bioconversão (KUHAD; SINGH, 1993). De acordo com Parisi (1989) a utilização de materiais lignocelulósicos somente terá interesse comercial de todas as suas frações forem devidamente aproveitadas, principalmente a fração hemicelulósica, haja vista que apenas o componente celulósico tem sido tradicionalmente utilizado em processos industriais. O termo estrutura lignocelulósica refere-se a parte do vegetal que forma a parede celular, composta por uma estrutura dura e fibrosa composta basicamente por carboidratos (celulose e hemicelulose) os quais estão ligados a uma estrutura contendo substâncias aromáticas, denominada lignina.

Dentre os materiais lignocelulósicos considerados como potenciais fontes alternativas para geração de diferentes produtos de interesse econômico e social podem ser destacados o bagaço de cana de açúcar e a palha de diversos cereais (FELIPE *et al.*, 1997 a; KADEAN; FORREST; JACOBSON, 2000; LATIF; ROJOKA, 2000; MUSSATTO, 2003).

O material lignocelulósico é composto principalmente por celulose (35-50%), seguido de hemicelulose (20-35%), lignina (10-25%) e uma pequena parte de extratos, isto é, ácidos insaturados (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). A composição quantitativa e qualitativa de alguns compostos varia dependendo da espécie vegetal em questão (SAHA, 2003).

Apresentando função estrutural na parede celular vegetal, um suporte para a membrana celular, a celulose é um polímero linear de celobiose, composto por D-Glicose com ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , possui elevada massa molar e alta cristalinidade. (KUHAD; SINGH, 1993). A rigidez deste composto, é um dos principais obstáculos para sua quebra através da hidrólise, independentemente do método empregado (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; PARISI, 1989).

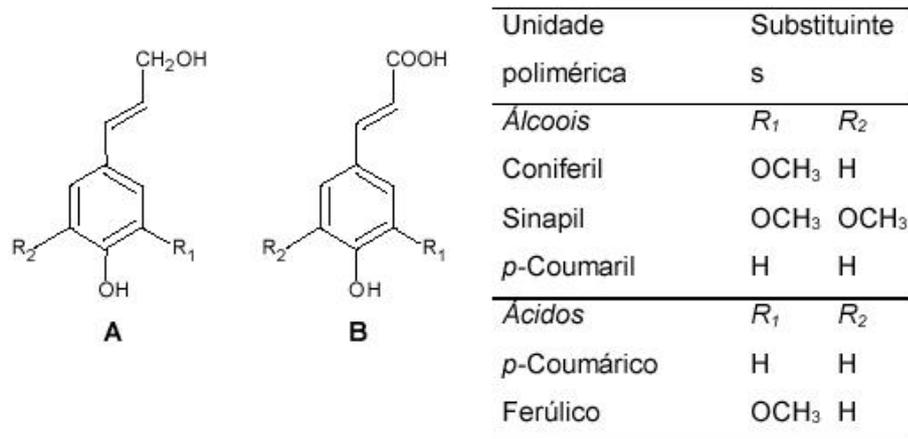
A hemicelulose, apesar de disposta por todas as camadas da parede celular do vegetal, encontra-se concentrada nas camadas primárias e secundárias, associada à celulose e lignina (BISARIA; GHOSE, 1981). Sua estrutura não é

cristalina, o que facilita a hidrólise (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Composto de 20 a 40% da lignocelulose, ao contrário da celulose, a hemicelulose é formada por cadeias ramificadas de açúcares de cinco e seis carbonos, como por exemplo: a D-xilose, L-arabinose, D-glicose, galactose e manose, sendo de fácil hidrólise (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Sua característica estrutural molecular assemelha-se a “galhos” constituídos por pentoses D-xilose e L-arabinose, e hexoses D-galactose, D-glicose, D-manose e ácidos urônicos. A proporção de D-manose e D-xilose podem ser distintas dependendo da espécie vegetal em questão, as quais podem ser divididas em dois grupos: as de madeira mole (com altas proporção de manose) e as de madeira dura (com altas concentrações de xilose) (PETTERSEN, 1984).

Na última camada está a lignina composto de 10 a 25% da biomassa presente em todo o material lignocelulósico. Esta fração é definida como um material amorfo e polifenólico, originado de uma polimerização desidrogenativa (mediada por enzimas) de três monômeros fenilpropanóides, os álcoois coniferil, sinapil e *p*-coumaril. É um polímero, tridimensional, desprovido de unidades regulares e, repetidamente ordenadas, como encontrado em outros polímeros naturais como a celulose e as proteínas (LIN; DENCE, 1992). Além disto, as ligninas podem ser divididas em duas classes de acordo com substituintes do esqueleto fenilpropanóide, ou seja, as ligninas guaiacil (que possuem um grupo metóxi no carbono de posição 3) e as ligninas siringil (na qual o grupo metóxi está localizado nos carbonos 3 e 5) (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 b).

Nas ligninas de madeira mole, normalmente referidas como ligninas guaiacil, os elementos estruturais são derivados principalmente do álcool coniferil (mais que 95% do número total de unidades estruturais), com o restante consistindo principalmente de unidades do tipo álcool *p*-coumaril e quantidades traços de unidades derivadas de álcool sinapil. As ligninas de madeira dura, chamadas de ligninas guaiacil-siringil, são constituídas de unidades de álcool coniferil e álcool sinapil em proporções variadas. As ligninas de gramíneas, em geral, são também classificadas como ligninas guaiacil-siringil, contudo, diferentemente das ligninas de madeira dura, contém adicionalmente pequenas, mas significativas quantidades de elementos estruturais derivados do álcool *p*-coumaril, contendo também resíduos de ácido *p*-coumárico e ácido ferúlico, ligados no interior da lignina através de ligações

éster. Na Figura 2.2 encontram-se os esquemas representativos das unidades dos álcoois coniferil, sinapil, *p*-coumaril, bem como dos ácidos *p*-coumarico e ferúlico.



**Figura 2.2.** Unidades poliméricas encontradas na lignina (A) álcoois e (B) ácidos (adaptado de LINCE; DENCE, 1992).

Além dos três componentes majoritários, a parede celular da biomassa vegetal apresenta outros constituintes, em menor proporção, que são classificados como extrativos (ácidos graxos, resinas, taninos, dentre outros) e não extrativos (sílica, oxalatos, carbonatos, dentre outros) sendo que suas composições variam de acordo com a espécie vegetal (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; KUHAD; SINGH, 1993;).

Para a obtenção de açúcares monoméricos, fontes de carbono para um processo fermentativo, os polissacarídeos constituintes da matéria-prima devem ser hidrolisados em seus açúcares correspondentes, os quais podem originar, através de bioconversão produtos de interesse comercial (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998 c).

A hidrólise da hemicelulose facilita a recuperação seletiva do complexo lignocelulósico da biomassa vegetal. Esta seletividade constitui um fator importante, visto que, a xilose, principal açúcar da hemicelulose nas “hardwood”, pode ser convertida em diferentes produtos daqueles obtidos pela utilização de glicose, que é o principal açúcar resultante da hidrólise da celulose (SILVA; ROBERTO, 1999). A grande proporção de pentoses, particularmente xilose, na fração hemicelulósica, aliada à sua maior facilidade de extração do complexo lignocelulósico, tem atraído a atenção de pesquisadores na utilização destes em processos de bioconversão.

Entre os processos de bioconversão, a obtenção biotecnológica de xilitol a partir de fontes lignocelulósicas tem se destacado como amplamente viável (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998 a).

Submetendo-se os materiais lignocelulósicos à hidrólise, muitos compostos de interesse tanto industrial quanto médicos são liberados. Este fato torna os hidrolisados de importância econômica e ecológica, visto que consistem de uma fonte energética renovável e de baixo custo (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES 2003). Entre os processos fermentativos de microrganismos que podem ser conduzidos empregando estes hidrolisados, destaca-se, por exemplo, a bioconversão de xilose em xilitol (HANH-HÄGERDAL *et al.*, 1994) e a produção de etanol (PALMQVIST *et al.*, 1999).

Por outro lado, muitos compostos tóxicos aos microrganismos podem ser liberados durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, tais como: ácido acético, derivados de fenol, furfural, hidroximetilfurfural, os quais podem inibir a atividade metabólica microbiana (SILVA *et al.*, 2004; SILVA; ROBERTO, 2001). Este fato tem direcionado muitos pesquisadores a estudar o efeito de inibição metabólica destes compostos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos (PALMQVIST *et al.*, 1999).

De acordo com Parajó; Dominguez e Dominguez (1998 a), os inibidores contidos nos hidrolisados podem limitar o consumo da fonte de carbono reduzindo a cinética de crescimento ou, até mesmo, impedindo o processo fermentativo. Além disto, os tipos e as quantidades dos componentes tóxicos variam de acordo com a matéria-prima utilizada, bem como as condições de hidrólise empregadas.

### **2.2.1. Palha de Arroz**

O arroz (*Oryza sativa* L.), planta pertencente à família das gramíneas, é largamente cultivado no planeta. Foi originariamente cultivado na Ásia e depois se espalhou pela África, América e Europa. O Brasil foi o primeiro maior produtor não asiático com cerca de 6.500.000 t médias, e sua cultura em nosso país data dos primeiros períodos da colonização. Atualmente cerca de 50 países contribuem com uma produção de aproximadamente 100 milhões de toneladas de arroz anualmente (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000).

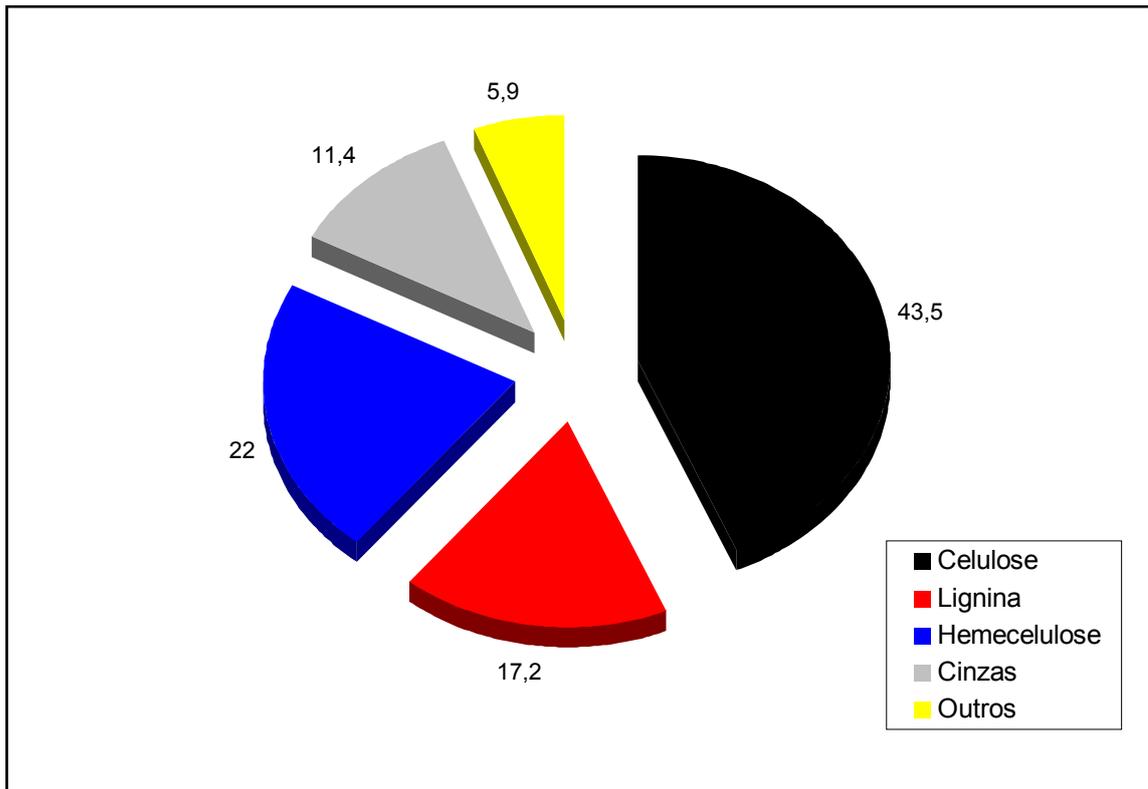
Segundo o IBGE, a produção de arroz com casca na safra de 2000/2001 foi de, aproximadamente, 11 milhões e para o ano de 2007 é esperada uma safra semelhante com um rendimento médio nacional de 3,738 kg/hectares, onde só estado de São Paulo gera 2,865 kg/hectares médio. Segundo Mussatto 2002, o rendimento nacional é capaz de gerar um resíduo de palha de arroz equivalente a 15 milhões de toneladas.

O depósito de grandes quantidades de resíduos no solo pode promover alterações no ecossistemas (SUN *et al.*, 2000). A eliminação deste resíduo por queimada pode provocar danos para a saúde humana (JACOBS *et al.*, 1997), representando custos na área de saúde, além de contribuir para o aumento do aquecimento global (ARBEX, 2001).

Tendo em vista, que a economia de muitos países em desenvolvimento é também sustentada com o cultivo de arroz (IBGE), é de extrema importância contornar o problema do acúmulo do resíduo produzido por esta cultura, criando formas de aproveitamento que sejam benéficos ao homem (MUSSATTO; ROBERTO 2002). Como um exemplo de fonte renovável, vem sendo empregado como alimento complementar de rebanhos de bovinos e ovinos; cobertura morta de pomares; forragens de baias; como fonte de energia renovável, dentre outros. De acordo com CONSEMA nº 002/000, a palha de arroz faz parte do grupo dos combustíveis alternativos ou resíduos normalmente utilizados como combustíveis secundários, podendo ser empregado em termoelétricas e usinas de biomassa.

Esta aplicação se torna possível graças a sua constituição ser de materiais lignocelulósicos fibrosos de elevado valor nutritivo (MUSSATTO; ROBERTO, 2002).

De maneira geral a composição de palha de arroz apresenta de 11,4 % de teor de cinzas (MUSSATTO, 2002) onde em média esta fração contém um percentual de 75% SiO<sub>2</sub>; 10% K<sub>2</sub>O; 3% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 3% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 1,3% de CaO e traços de Mg, S e Na (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000). Os principais componentes orgânicos são: celulose, hemicelulose e lignina, nas proporções (%) apresentada na Figura 2.3.



**Figura 2.3** Composição da Palha de Arroz (%) adaptado (MUSSATTO; ROBERTO 2002).

Devido à sua elevada quantidade de pentoses, este resíduo lignocelulósico chama a atenção para seu potencial biotecnológico, uma vez que pode ser utilizado como matéria-prima na produção de produtos industriais como xilitol e etanol (CORTEZ, 2005; MUSSATTO; ROBERTO, 2003; ROBERTO *et al.*, 1995).

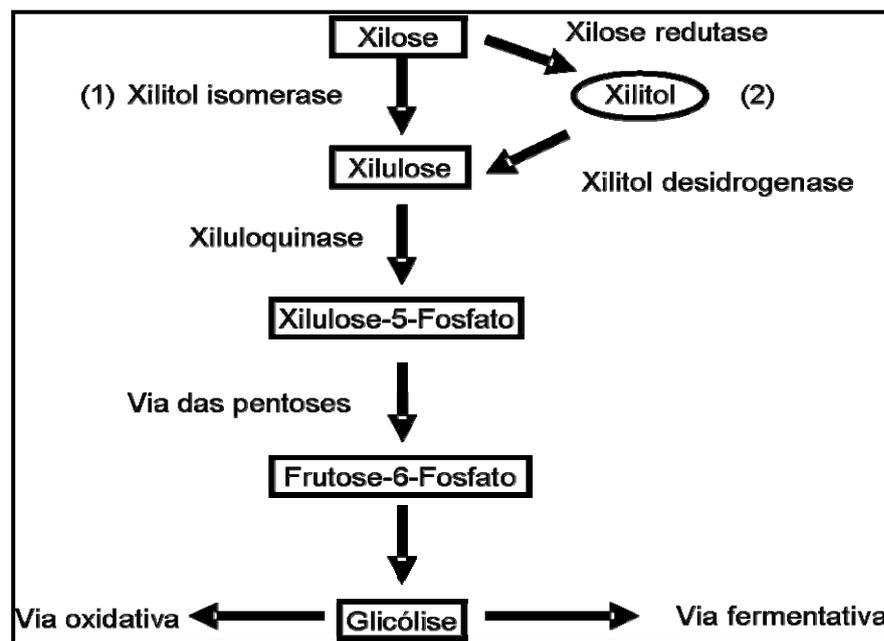
Para disponibilizar os açúcares usados no processo de bioconversão, os polissacarídeos constituintes devem ser hidrolisados (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998 b). Contudo, durante o processo de hidrólise, muitos compostos podem ser formados ou liberados, com propriedades que podem ser inibitórias aos microrganismos empregados nos processos fermentativos (PALMQVIST; HAN-HÄGERDAL, 2000 a).

### 2.3. Gênero *Candida* como Modelo para o Metabolismo da D-xilose

Muitos microrganismos são capazes de metabolizar a xilose, como exemplo: *Escherichia coli*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio fibrisolvens*,

*Zymomonas mobilis* (JACKSON; NICOLSON, 2001), *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus xylosus* e *Salmonella* (ERLANDSON *et al.*, 2000).

A capacidade de metabolizar a xilose é observada em bactérias através da enzima xilose isomerase (EC 5.3.1.5) (Figura 2.4), gerando D-xilulose diretamente, sem a necessidade de cofatores. (JACKSON; NICOLSON, 2001; JIN; LAPLASA; JEFFRIES, 2004). A D-xilulose pode seguir pela via das pentoses fosfato ou fosfocetolase para gerar energia, ribose e compostos orgânicos (ERLANDSON *et al.*, 2000). Porém algumas leveduras deficientes desta enzima também são capazes de utilizar este carboidrato com a aldose (xilose) redutase (EC 1.1.1.21) dependente de NADPH ou NADH que forma o xilitol como intermediário que é convertido à D-xilulose pela xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9) dependente de NADP ou NAD (JIN; LAPLASA; JEFFRIES, 2004), desta forma, o acúmulo de xilitol durante o metabolismo da xilose só será possível para estas leveduras (JACKSON; NICOLSON, 2001).



**Figura 2.4.** Esquema simplificado do metabolismo de xilose (1) passo seguido pela maioria das bactérias, actinomicetos e eucariontes; (2) passo seguido por leveduras e fungos filamentosos (JACKSON; NICOLSON, 2001).

Sampaio *et al.* (2003) pesquisou a capacidade de produzir xilitol por dez cepas de *Penicillium* e uma cepa de *Aspergillus niger* empregando processo descontínuo. No entanto, a produção em geral foi baixa, dentro das condições de crescimento utilizadas no estudo. Dentre as cepas estudadas, o *Penicillium crustosum*

apresentou a mais alta taxa de produção, 0,52 g/L de xilitol à partir de 11,50 g/L de D-xilose, representando um consumo de 76% da D-xilose original, que, quando comparada com a taxa de produção de *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, de 16 a 17 g/L de xilitol à partir de 30 g/L de xilose, não foi favorável ao desenvolvimento de processos industriais para os fungos filamentosos em questão.

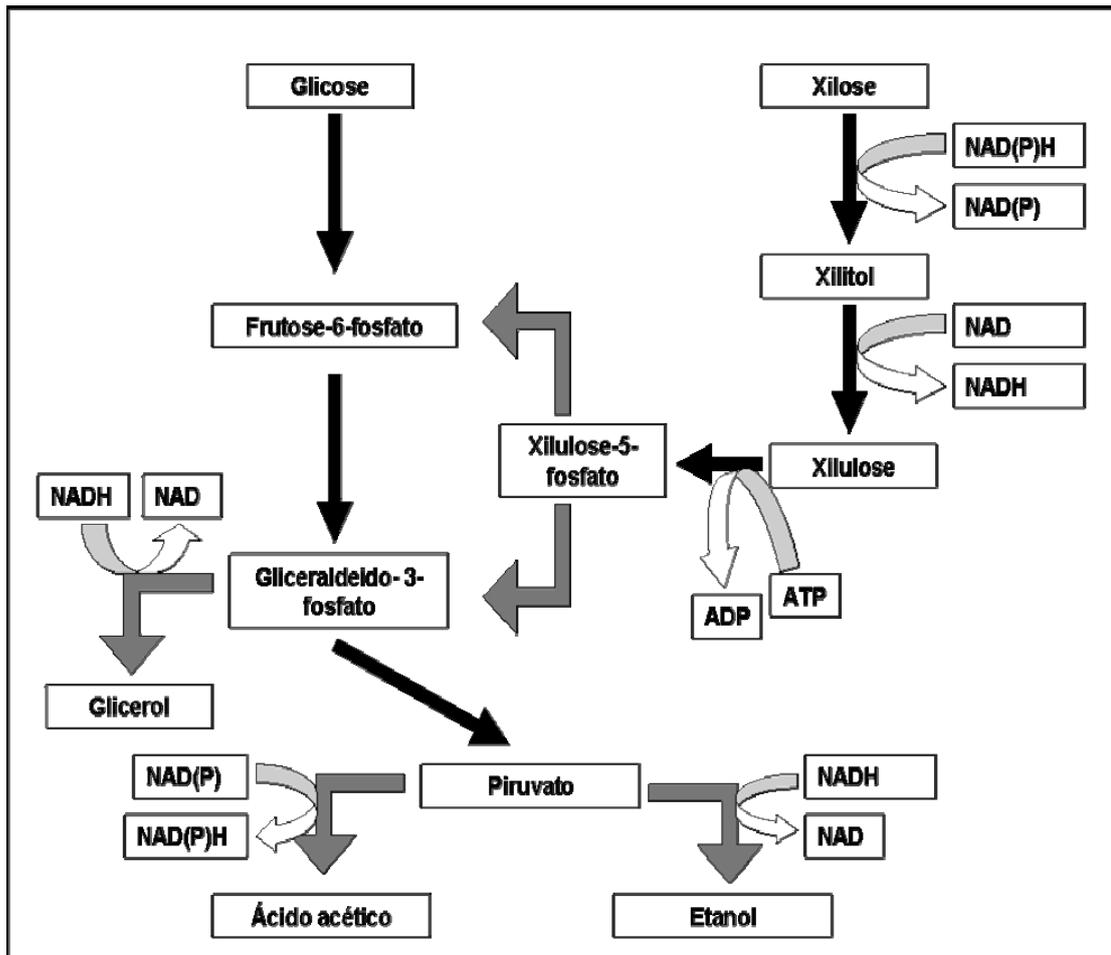
Desde a descoberta, em 1981, da capacidade das leveduras em fermentar a D-xilose, a rota metabólica destes organismos tem sido amplamente estudada. O conhecimento de que leveduras como *Candida utilis*, são capazes de crescer em substratos contendo xilose, foi de grande importância para o desenvolvimento da biotecnologia da bioconversão de xilose em xilitol (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1994). Dentre os microrganismos estudados para bioconversão, as leveduras são consideradas “os melhores produtores de xilitol”, e por isso, estas são citadas na maioria das publicações, sendo as que mais se destacam as do gênero *Candida* (MAYERHAFF *et al.*, 1996). Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo da bioconversão de xilose em xilitol utilizando leveduras principalmente do gênero *Candida* nos mais diferentes substratos, como mostra a Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Aplicação do gênero *Candida* na bioconversão de xilose em xilitol.

Cepa	$Y_{P/S}$ (g/L)	Xilose (g/L)	$Q_P$ (g/Lh)	Meio de cultivo	Referência
<i>C.guilliermondii</i>	0,59	90	0,55	MD	Cortez 2005
<i>C.guilliermondii</i>	0,62*	85	0,53*	HHPA	Silva, 1999
<i>C.tropicalis</i>	0,60	100	0,14	HHEM	Latif e Rajoka, 2000
<i>C.parapsilosis</i>	0,63	50	0,24	MD	Furlan e Castro, 2001

\*calculado dos valores dados na literatura de referência, MD = meio definido, HHPA= Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, HHEM = Hidrolisado Hemicelulósico de espiga de milho.

Leveduras do gênero *Candida* são excelentes organismos modelo para o estudo da produção de xilitol a partir da xilose (Figura 2.5), pois são capazes de utilizar este composto como única fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento. Este fato se deve por apresentarem a rota metabólica da pentose fosfato (RPF) bem desenvolvida. A RPF é dividida em fase oxidativa e não oxidativa. A fase oxidativa da RPF converte a hexose fosfato para pentose fosfato liberando



**Figura 2.5** Via metabólica simplificada da xilose e glicose por levedura (GASTRÖN, 2002).

NADPH para rota biossintética. A fase não oxidativa converte a pentose fosfato em hexose fosfato e triglicerídeos. A RPF libera também ribose-5-fosfato requerido para síntese de ácidos nucleicos e histidina e a eritrose-4-fosfato requeridos para síntese de aminoácidos aromáticos (GASTRÖM, 2002). Entretanto, sabe-se que a maior desvantagem deste gênero é que apresenta espécies patogênicas como a *Candida albicans*, este fato torna este gênero de importância tanto clínica (VARGAS; JOLY, 2002) quanto industrial (LIMA *et al.*, 2004). A Tabela 2.2 mostra alguns estudos da aplicação industrial do gênero *Candida*.

**Tabela 2.2.** Estudos da aplicação do gênero *Candida* na indústria.

Produto	Cepa	Referência
Manitol e Glicerol	<i>C. neoformans</i>	Onishi e Suzuki, 1968
D-Arabitól	<i>C. famata</i>	Ahmed, 2001
Lípase	<i>C. rugosa</i>	Fadiloglu e Erkmen, 2002
Ácido cítrico	<i>C. oleophila</i>	Anastassiadis e Rehm, 2006
Soforolipídios	<i>C. bombicula</i>	Pekin e Vardar-Sukan, 2006

Segundo Gaström (2002) a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos aprova o uso de *Candida guilliermondii* (ATCC 200474) e *Candida lipolytica* na composição secundária de alimentos para humanos como produção de ácido cítrico.

### 2.3. Ação de Inibidores Presentes no Hidrolisado

Segundo Olsson e Hahn-Hagerdal (1996), os compostos inibitórios, tóxicos aos microrganismos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos podem ser divididos em cinco grupos:

- 1) as substâncias liberadas durante a pré-hidrólise e hidrólise, incluindo o ácido acético (liberado da degradação da estrutura da hemicelulose) e extrativos (terpenos, álcoois e compostos aromáticos tais como taninos);
- 2) um grupo de subprodutos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido levulínico, ácido fórmico e substâncias húmicas) oriundos da degradação dos açúcares durante o processo de pré-hidrólise e hidrólise;
- 3) os produtos de degradação da lignina, também produzidos durante a pré-hidrólise e hidrólise, incluindo uma grande variedade de compostos aromáticos e poliaromáticos com uma variedade de substituintes;
- 4) os produtos provenientes do processo fermentativo, tais como etanol, ácido acético, glicerol, ácido láctico; e
- 5) os metais liberados do equipamento de hidrólise e aditivos, tais como, SO<sub>2</sub>.

De uma forma geral, não pode ser estabelecida a concentração máxima permissível de cada inibidor presente no meio, uma vez que esta é fortemente dependente de fatores como o microrganismo a ser utilizado e o seu grau de

adaptação ao processo fermentativo empregado, além da presença simultânea de vários outros inibidores (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998 a).

A obtenção de um modelo otimizado para o processo fermentativo somente será conseguida mediante um entendimento dos mecanismos inibitórios dos compostos individuais e seus efeitos de interação, bem como a influência dos parâmetros ambientais (por exemplo, pH, nível de inóculo, concentração do composto inibitório, temperatura, dentre outros fatores), não deixando de considerar as taxas de bioconversão e a resposta adaptativa do microrganismo aos compostos tóxicos. Dentro deste contexto, vários estudos têm sido desenvolvidos para a identificação dos compostos inibitórios dos hidrolisados hemicelulósicos, sendo que, o conhecimento a respeito destes e como minimizar seus efeitos é de grande importância para que se realize um processo fermentativo com grande eficiência (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996; PALMQVIST ; HAHN-HAGERDAL, 2000 b)

O ácido acético, liberado a partir da hidrólise da hemicelulose (LIMA *et al.*, 2004), é apontado como um grande inibidor do metabolismo microbiano interferindo no crescimento celular e na produção de xilitol, principalmente quando *Candida guilliermondii* é empregada (SILVA *et al.*, 2004). Este composto inibe o metabolismo por interferência com o transporte de fosfato da membrana celular, resultando na alteração da morfologia celular (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). No citoplasma, o ácido acético, dissocia-se em hidrônio e íons acetato, diminuindo o pH intracelular. Como consequência, as rotas metabólicas são afetadas devido aos danos à catálise enzimática. As leveduras têm um sistema de homeostase dependente da translocação-prótons na membrana citoplasmática H-ATPase, e em presença do deste ácido, a levedura desvia ATP para o transporte de prótons (HOLYOAK *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2004).

O efeito do ácido acético nas fermentações de xilose por *Candida guilliermondii* FTI 20037 foi estudado por Felipe *et al.* (1995). Neste trabalho foi utilizado o meio definido contendo diferentes concentrações do ácido (0,0, 0,5, 1,0, 3,0, 6,0 e 12,0 g/L). Os autores constataram que o aumento da concentração do ácido até 1,0 g/L levou a um favorecimento no rendimento e produtividade em xilitol. Além disso, foi observado que a levedura foi capaz de assimilar o ácido juntamente com os açúcares, sendo completamente consumido em concentrações menores que 3,0 g/L, sugerindo que *C. guilliermondii* age como agente de detoxificação do meio. Ainda de acordo com estes autores, há variações nos níveis de tolerância ao ácido

acético e estas variações devem ser atribuídas as diferentes espécies de microrganismos avaliados e às condições experimentais adotadas, especialmente com relação ao pH de fermentações.

O efeito tóxico do ácido acético é acentuado com o emprego de baixos valores de pH no meio (FELIPE *et al.*, 1997 b), devido à entrada do ácido em sua forma não dissociada no interior da célula. A difusão do ácido acético para dentro da célula, especialmente sob estas condições, deve induzir a acidificação do citoplasma, resultando no desacoplamento da produção de energia e do transporte de vários nutrientes. (GULDFELDT; ARNEBORG, 1997)

Delgenes *et al.* (1996) estudaram os efeitos dos produtos de degradação de lignocelulose nas fermentações de glicose e xilose (20 g/L) por *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*. Os compostos tóxicos (furaldeído, acetato, 5-hidroximetilfuraldeído, vanilina, hidroxibenzaldeído e siringaldeído) foram adicionados em concentrações que variaram de 0,2 a 15,0 g/L. Segundo os autores, as fermentações foram significativamente afetadas pela presença dos compostos, e o grau de inibição dependeu grandemente da natureza e concentração dos inibidores bem como da natureza dos microrganismos. Além disto, foi constatado que para as quatro cepas testadas, vanilina foi o composto mais inibidor, também se observou que alguns dos inibidores (particularmente vanilina e furaldeído) puderam ser metabolizados pelos organismos fermentativos durante um período de incubação mais prolongado, resultando na remoção dos materiais tóxicos e na recuperação parcial tanto do crescimento como da produção de etanol.

Em estudos da bioconversão de xilose em xilitol por *Candida parapsilosis* à partir do hidrolisado de alamo, Preziosi-Belloy, Nollet e Navarro (1997) avaliaram o grau de toxicidade do hidrolisado, o qual foi obtido por auto-hidrólise em explosão a vapor. O hidrolisado continha os açúcares (xilose, glicose e manose) e os inibidores (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, vanilina e siringaldeído). Para este propósito foram preparados meios definidos suplementados com os compostos em concentrações proporcionais às encontradas no hidrolisado. Estes autores constataram que em meios contendo vanilina (0,1 g/L) ou siringaldeído (0,1 g/L), os resultados de rendimento e produtividade em xilitol foram similares aos encontrados no ensaio controle (não suplementado com inibidor). A assimilação de ácido acético (2,9 g/L) interferiu no consumo da glicose, sendo necessárias 18 horas para o consumo da hexose. Ao contrário do observado nos meios suplementados com cada

inibidor, quando todos eles foram adicionados no meio fermentativo, não houve crescimento celular, sugerindo que estes compostos agem cumulativamente para inibir a atividade fermentativa, interferindo no consumo de açúcares ou de outros elementos essenciais.

Ranatunga *et al.* (1997) identificaram alguns componentes, encontrados no hidrolisado de serragem (composto por carvalho vermelho, carvalho branco e alamo amarelo, na proporção 1:1:1), que poderiam promover a inibição da bactéria recombinante *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5) durante a fermentação de xilose para a obtenção de etanol. Neste estudo foram identificados no hidrolisado os compostos: ácido gálico, 5-hidroximetilfurfural, vanilina, ácido protocatecoico, siringaldeído, furfural, álcool coniferil, ácido sinápico e ácido capróico. Após a identificação dos possíveis compostos inibitórios, os mesmos e um alcalóide (glaucina) foram avaliados individualmente com o intuito de se determinar seus efeitos tóxicos na produção de etanol pela bactéria. Os resultados indicaram que dentre os compostos analisados, os de maior efeito inibitório em ordem decrescente foram: o ácido acético, o ácido capróico, furfural, vanilina e siringaldeído.

Segundo Lee *et al.* (1999) os produtos de degradação dos açúcares (5-hidroximetilfurfural, furfural e ácido levulínico) presentes no hidrolisado de carvalho afetam em menor grau a fermentações por *Saccharomyces cerevisiae* do que os produtos de degradação da lignina (ácido p-hidroxibenzóico, vanilina, siringaldeído, ácido vanílico, ácido siríngico, dentre outros). Estes autores verificaram que a vanilina numa faixa de concentração de 1 a 2,5 g/L, promoveu uma fase de latência. Porém, o processo foi recuperado obtendo-se ao final, os mesmos resultados obtidos no controle. Contudo, acima de 3,0 g/L a toxicidade não foi contornada. Siringaldeído se mostrou menos tóxico do que a vanilina. Também foi observado que os ácidos aromáticos foram menos tóxicos do que seus correspondentes aldeídos.

Zaldivar, Martinez e Ingram (1999) investigaram a toxicidade do furfural, 5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído e vanilina sobre o crescimento e a produção de etanol por *Escherichia coli* B (cepas KO11 e LY01). Os autores observaram que o furfural foi mais tóxico do que o 5-hidroximetilfurfural e dos aldeídos aromáticos, 4-hidroxibenzaldeído foi o mais tóxico seguido pela vanilina e siringaldeído. Além disto, foi observado que a toxicidade de todos os aldeídos, exceto furfural, foram aditivas quando testadas em combinações binárias (50% de inibição no crescimento). As combinações de furfural com os aldeídos foram

sinérgicas e causaram mais que 75% de inibição no crescimento. Finalmente, foi constatado que a danificação da integridade da membrana não é o principal mecanismo de inibição do crescimento por furanos e aldeídos aromáticos.

A toxicidade dos ácidos aromáticos derivados da lignina (ácidos ferúlico, gálico, 4-hidroxibenzoico, siríngico e vanílico), do ácido acético proveniente da hidrólise da acetilxilana e de outros derivados da degradação dos açúcares (ácidos furóico, fórmico, levulínico e capróico) sobre as fermentações de *Escherichia coli* LY01 foi também investigada por Zaldivar e Ingram (1999). Segundo os autores, a toxicidade foi devida à hidrofobicidade e não a danificação da membrana celular. Além disto, os outros constataram que as combinações dos ácidos promoveram acentuada inibição do crescimento celular. Ao contrário dos aldeídos, a toxicidade dos ácidos orgânicos foi afetada pelo pH inicial, o que pode ser explicado pelo colapso de gradientes iônico e o aumento da concentração iônica no interior das células.

Zaldivar, Martinez e Ingram (2000) examinou os efeitos individuais e em combinações binárias de seis (6) álcoois aromáticos (catecol, álcool coniferil, guaiacol, hidroquinona, metilcatecol e álcool vanilil) e álcool furfuril, na produção de etanol a partir de xilose pela bactéria etanológica *Escherichia coli* LY01. Foi constatado que os álcoois inibiram a produção de etanol através da inibição do crescimento e expansão do biocatalisador. Em combinação binária, o grau de inibição do crescimento foi rigorosamente aditivo para a maioria dos compostos testados (quando empregada menor concentração de inóculo). As combinações com álcool furfuril e furfural (furaldeído) apresentaram efeito sinérgico, aumentando assim a toxicidade. Além disto, foi constatado que a toxicidade dos compostos em estudo estava diretamente relacionada à hidrofobicidade dos mesmos, porém, a danificação da membrana apresentou ser um fator mais importante para a toxicidade dos álcoois do que para os ácidos ou aldeídos.

Cortez (2005) demonstrou em seus estudos que individualmente o siringaldeído (2 g/L) influenciou negativamente consumo de xilose e produção de xilitol, sendo que a vanilina (2 g/L) não apresentou efeitos negativos. Verificou ainda que, quando ambos os compostos são avaliados em conjunto, o fator de conversão em xilitol não foi afetado, porém foi observado um efeito de interação entre estes compostos. De acordo com os autores o maior efeito negativo dos compostos

fenólicos sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* é sobre a produtividade volumétrica de xilitol.

Klinke *et al.* (2003) estudaram os inibidores potenciais obtidos à partir da oxidação úmida de palha de trigo e seus efeitos na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Nove (9) fenóis (4-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, 4-hidroxiacetofenona, acetovanilona, acetosiringona, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido siríngico) e ácido 2-furóico, identificados como presentes no hidrolisado foram, cada um, testados em concentrações que variaram de 50 a 100 vezes a concentração encontrada no hidrolisado, ou seja, a 10 mM. A influência dos compostos foi estudada em um meio definido e no hidrolisado tratado com oxidação úmida. Os autores observaram que em meio definido a adição de 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, 4-hidroxiacetofenona e acetovanilona causaram um decréscimo de 53 a 67% na produtividade volumétrica em etanol (quando comparado ao controle); ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido siríngico bem como ácido 2-furóico, siringaldeído e acetosiringona, foram menos inibitórios. Pela adição dos mesmos compostos ao hidrolisado observou-se que siringaldeído e acetovanilona interagiram negativamente com os componentes do hidrolisado, causando um drástico decréscimo na produtividade em etanol, quando comparados ao meio definido. Foi observado também que, após 6 horas de fermentação, no meio adicionado com 10 mM de fenóis, os aldeídos foram assimilados e seus correspondentes álcoois (4-hidroxibenzilálcool, álcool vanilil e álcool siríngil) foram encontrados.

A capacidade produtiva da levedura associada à sua tolerância a compostos com efeitos inibitórios, determinam o sucesso do processo fermentativo. Estes compostos podem interferir com o metabolismo microbiano e, desta forma, limitar a eficaz utilização dos açúcares presentes no hidrolisado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 a).

### 3. OBJETIVOS

#### **Geral:**

O presente trabalho visa estudar os efeitos de compostos inibidores que normalmente são formados durante o processo de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, sobre a bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

#### **Específicos:**

- Avaliar o efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre o crescimento de *C. guilliermondii* produção de xilitol, empregando-se meios definidos, em pH controlado;
- Avaliar os efeitos individuais e de interação entre os compostos inibidores (AA, AF e SI), adotando-se o método do planejamento fatorial, em meio definido, com pH controlado e não controlado;
- Avaliar os efeitos do AA, AF e SI sobre o crescimento de *C. guilliermondii* em meio de fermentação formulado com hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, obtido por hidrólise ácida;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena da USP, selecionada para produção de xilitol (BARBOSA, *et al.*, 1988). A cultura foi repicada em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e após incubação em estufa a 30 °C por 24 h, a cultura foi conservada em geladeira a 4 °C para posterior preparo do inóculo.

### 4.2. Preparo do inóculo

Células de *C. guilliermondii*, recém repicadas em meio de manutenção, foram transferidas em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina, para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo descrito na Tabela 4.1. Os frascos foram incubados a 30 °C em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 200 rpm durante 30 h. Após este período, as células foram separadas por centrifugação a 2000 x g por 20 min, lavadas e ressuspensas com água destilada esterilizada, de forma a se obter uma suspensão celular com cerca de 50 g/L. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio de fermentação com uma concentração celular inicial de 3 g/L.

Para o preparo do meio de cultura foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente e autoclavadas a 112 °C por 15 min (xilose: 20% e glicose: 15%) e 121 °C por 20 min (cloreto de cálcio diidratado: 1%, extrato de farelo de arroz e sulfato de amônio: 7%). Os componentes foram então misturados assepticamente, de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura.

Para a utilização do farelo de arroz como nutriente, foi preparada uma suspensão de farelo em água destilada numa proporção de 10% (p/v). Após a autoclavagem da suspensão por 20 min a 121 °C, esta foi centrifugada em condições assépticas a 2000 x g por 20 min. A fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e conservada em geladeira a 4 °C até a sua utilização, nunca por um período superior a uma semana.

**Tabela 4.1.** Composição do meio definido utilizado para crescimento do inóculo.

Componente	Concentração (g/L)
Xilose	30,0
Glicose	5,0
Sulfato de amônio	3,0
Extrato de farelo de arroz	20,0
Cloreto de cálcio diidratado	0,1

#### 4.3. Efeito do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído na Bioconversão de Xilose em Xilitol em Meio Definido

Nesta etapa, o meio de fermentação foi composto pelos nutrientes descritos na Tabela 4.2. Foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente. As soluções de xilose (40%) e glicose (15%) foram autoclavadas a 112 °C por 15 min, enquanto que as soluções de extrato de farelo de arroz (10%), cloreto de cálcio diidratado (1%) e sulfato de amônio (7%) foram autoclavadas a 121 °C por 20 min. As soluções de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  foram preparadas a partir de uma solução estoque (0,6 M) no pH desejado (5,5), a qual foi autoclavada a 121 °C por 20 min. Para o preparo da solução estoque adotou-se a proporção de 3 partes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 parte de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Após a mistura dos nutrientes, o meio de fermentação foi suplementado com as mesmas dos compostos de forma a obter as seguintes concentrações: ácido acético (0,8, 1,1 e 2,6 g/L); ácido ferúlico (0,2, 0,4 e 0,6 g/L) e siringaldeído (0,3, 0,5 e 0,8 g/L).

**Tabela 4.2.** Composição do meio definido utilizado para o processo fermentativo.

Componente	Concentração (g/L)
Xilose	85,0
Glicose	15,0
Sulfato de amônio	3,0
Extrato de farelo de arroz	20,0
Cloreto de cálcio diidratado	0,1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	21,7
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	6,9

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de fermentação, inoculados com células cultivadas nas condições descritas para o preparo do inóculo. Os frascos foram incubados a 30 °C, em agitador rotatório a 200 rpm. Durante as fermentações, amostras foram retiradas periodicamente, a cada 24 h, para o acompanhamento da concentração de xilose, glicose, xilitol e de células e variação do pH.

#### **4.4. Efeito do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído na Bioconversão de Xilose em Xilitol, em Meio Definido, Empregando a Metodologia do Planejamento Experimental**

Nesta etapa, a influência das variáveis (ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído) sobre a bioconversão de xilose em xilitol foi avaliada empregando um planejamento fatorial completo de dois níveis  $2^3$  com três repetições no ponto central. Os níveis mínimos e máximos das variáveis foram, respectivamente, de 0 e 2,6 g/L para ácido acético; 0 e 0,6 g/L para o ácido ferúlico e 0 e 0,8 g/L para o siringaldeído. Os ensaios foram realizados com e sem adição de sais de fosfato no meio, conforme matriz apresentada na Tabela 4.3. As variáveis foram codificadas de acordo com a Equação 4.1:

$$V_C = (V_R - V_0) / \Delta V_R \quad (\text{Equação 4.1})$$

Em que:

$V_C$  – valor codificado da variável independente;

$V_R$  – valor real da variável independente;

$V_0$  – valor real da variável independente no ponto central;

$\Delta V_R$  – valor do passo, isto é  $(V_{R\text{máx}} - V_{R\text{mín}})/2$ .

**Tabela 4.3.** Matriz de planejamento experimental  $2^3$  com três repetições no ponto central, utilizada para avaliar o efeito do ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI), sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em meio definido com e sem adição de tampão.

Ensaio	Níveis codificados das variáveis			Níveis reais das variáveis		
	AA	AF	SI	AA	AF	SI
1	-1	-1	-1	0,0	0,0	0,0
2	+1	-1	-1	2,6	0,6	0,0
3	-1	+1	-1	0,0	0,0	0,0
4	+1	+1	-1	2,6	0,6	0,0
5	-1	-1	+1	0,0	0,0	0,8
6	+1	-1	+1	2,6	0,6	0,8
7	-1	+1	+1	0,0	0,0	0,8
8	+1	+1	+1	2,6	0,6	0,8
9/10/11	0	0	0	1,3	0,3	0,4

As condições de fermentação foram conduzidas conforme descrito no item 4.3.1 com a retirada de amostras nos tempos inicial, 72 h e 96 h. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o programa STATGRAPHICS (versão 5.0). A significância dos fatores experimentais foi testada pelo teste  $t$  de Student. Este teste, baseado na hipótese de que o verdadeiro parâmetro é zero, é utilizado para elucidar a significância dos fatores. Se o valor de  $t$  calculado ( $t_{\text{calc}}$ ) for superior ao  $t$  tabelado  $t_{(1-\alpha, \lambda)}$  para um nível de significância de  $\alpha$  e  $\lambda$  graus de liberdade, então o termo em causa contribui significativamente para a resposta.

Foram consideradas como respostas (variáveis dependentes) do planejamento experimental, o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ), o fator de conversão de xilose em células ( $Y_{X/S}$ ) e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ).

#### **4.5. Efeito do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído na Bioconversão de Xilose em Xilitol em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz**

##### **4.5.1. Obtenção e Tratamento do Hidrolisado**

Nesta etapa, as fermentações foram realizadas em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido por hidrólise ácida conforme procedimento descrito por Silva (2007). Aproximadamente, 13 kg de palha de arroz e 133L de solução de ácido sulfúrico (1%p/v) foram colocados em reator de aço inoxidável (AISI 316) com volume útil de 350L. A reação foi realizada a 120°C por cerca de 30 minutos, a uma agitação de 50 rpm e pressão manométrica de 180 KPa. Ao final da reação, o material foi centrifugado e a fração líquida recuperada (hidrolisado hemicelulósico) foi retornada ao reator para realização do processo de destoxificação. Este procedimento foi realizado segundo descrito por Mussatto e Roberto (2004b) nas seguintes condições: concentração de 3% m/v de carvão ativo em relação ao volume de hidrolisado, a 45°C por 30 minutos e agitação de 50 rpm. O hidrolisado hemicelulósico destoxificado, foi concentrado sob vácuo em evaporador com capacidade de 30 litros, a uma temperatura de 65°C, visando aumentar a concentração de xilose, no hidrolisado, para cerca de 120g/L. Este hidrolisado apresentou a seguinte composição em g/L: glicose (19,0); xilose (114,5); arabinose (17,1); ácido acético (2,3) e fenólicos totais (0,8).

##### **4.5.2. Meio de Fermentação**

O meio de fermentação foi preparado com o hidrolisado destoxificado e concentrado conforme descrito no item 4.4.1. O hidrolisado foi diluído em água destilada esterilizada de forma a se obter uma concentração inicial de xilose de 80 g/L. Antes da utilização dos hidrolisados diluídos como meio de fermentação, estes

tiveram os valores de pH ajustados para 5,5 com pastilhas de NaOH. Os ensaios foram realizados empregando o hidrolisado destoxificado concentrado como controle (HDC) e o hidrolisado destoxificado concentrado suplementado com 2,6 g/L de ácido acético, 0,6 g/L de ácido ferúlico e 0,8 g/L de siringaldeído.

#### **4.5.3. Condições de Fermentação**

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de fermentação, inoculados com 3,0 g/L de células cultivadas nas condições descritas para o preparo do inóculo. Os frascos foram incubados a 30 °C, em agitador rotatório a 200 rpm. Para o acompanhamento do crescimento celular, consumo de xilose, produção de xilitol, amostras foram retiradas nos tempos 0, 72 e 96 h.

#### **4.6. Métodos Analíticos**

##### **4.6.1. Determinação da Concentração Celular**

A concentração celular foi obtida mediante uma curva de calibração que correlaciona a densidade ótica (DO) com massa seca de células. Para a elaboração desta curva, células provenientes do cultivo de 50 mL de inóculo, foram centrifugadas a 2000 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas pelo menos 2 vezes com água destilada. Em seguida, as células foram ressuspensas em água destilada de forma a se obter uma suspensão homogênea densa (suspensão original), a qual foi utilizada para preparar suspensões com diversas diluições. As suspensões diluídas foram submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU 640) a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco. A massa seca de células foi determinada após secagem da suspensão original (alíquotas de 5 mL), em estufa a 105 °C por 24 h.

#### **4.6.2. Determinação do pH**

Os valores de pH foram determinados por potenciometria, em um aparelho da marca MICRONAL modelo B474, com correção de temperatura.

#### **4.6.3. Determinação da Concentração de Açúcares e de Produtos da Fermentação**

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, acético acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N desgaseificado; fluxo: 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração. As amostras foram primeiramente centrifugadas a 1800x g por 20 min para a remoção das células, sendo os sobrenadantes recolhidos e apropriadamente diluídos com água deionizada. Numa etapa posterior as amostras já diluídas foram passadas por filtros C18 SEP-PACK CARTRIDGE (Waters Associates - MILIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

#### **4.6.4. Determinação da Concentração de Compostos Fenólicos**

As concentrações de ácido ferúlico e siringaldeído foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna Waters Resolve C<sub>18</sub> 5 µm (3,9 x 300 mm); temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético e 0,16% ácido fosfórico) desgaseificado; fluxo: 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL e detector: UV a 276 nm. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 1800 x g por 20 min para a remoção das células. Os sobrenadantes foram recolhidos e passados por uma membrana do tipo HAWP 04700 com poros de 0,45 µm (Waters Associates - MILIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de uma curva de calibração obtida de soluções padrão.

#### 4.7. Metodologia de Análise dos Resultados

Para avaliação dos resultados obtidos nas diversas etapas do trabalho foram analisados os seguintes parâmetros fermentativos:

##### 1. Fator de Conversão de Substrato em Células $Y_{X/S}$ ( $g_{\text{células formadas}} / g_{\text{substrato consumido}}$ )

$$Y_{X/S} = \Delta X / -\Delta S_T = (X_f - X_i) / [(S_{1f} - S_{1i}) + (S_{2f} - S_{2i})]$$

Em que:

$X_i$  e  $X_f$  = Concentração inicial e final de células (g/L);

$t_i$  e  $t_f$  = Tempo inicial e final da fermentação (h);

$S_{1i}$  e  $S_{1f}$  = Concentração inicial e final de glicose (g/L) e

$S_{2i}$  e  $S_{2f}$  = Concentração inicial e final de xilose (g/L).

##### 2. Fator de Conversão de Xilose em Xilitol $Y_{P/S}$ ( $g_{\text{xilitol formado}} / g_{\text{xilose consumida}}$ )

$$Y_{P/S} = \Delta P / -\Delta S_2 = (P_f - P_i) / (S_{2f} - S_{2i})$$

Em que:

$P_i$  e  $P_f$  = Concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

$S_{2i}$  e  $S_{2f}$  = Concentração inicial e final de xilose (g/L).

##### 3. Produtividade Volumétrica em Xilitol $Q_P$ ( $g_{\text{xilitol formado}} / L.h$ ):

$$Q_P = \Delta P / \Delta t = (P_f - P_i) / (t_f - t_i)$$

Em que:

$P_i$  e  $P_f$  = Concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

$t_i$  e  $t_f$  = Tempo inicial e final da fermentação (h).

##### 4. Eficiência de Conversão $\eta$ (%)

$$\eta = (Y_{P/S} \text{ obtido} / Y_{P/S} \text{ teórico}) \times 100$$

Em que:

$Y_{P/S} \text{ teórico} = 0,917 \text{ g/g}$  (BARBOSA *et al.*, 1988).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

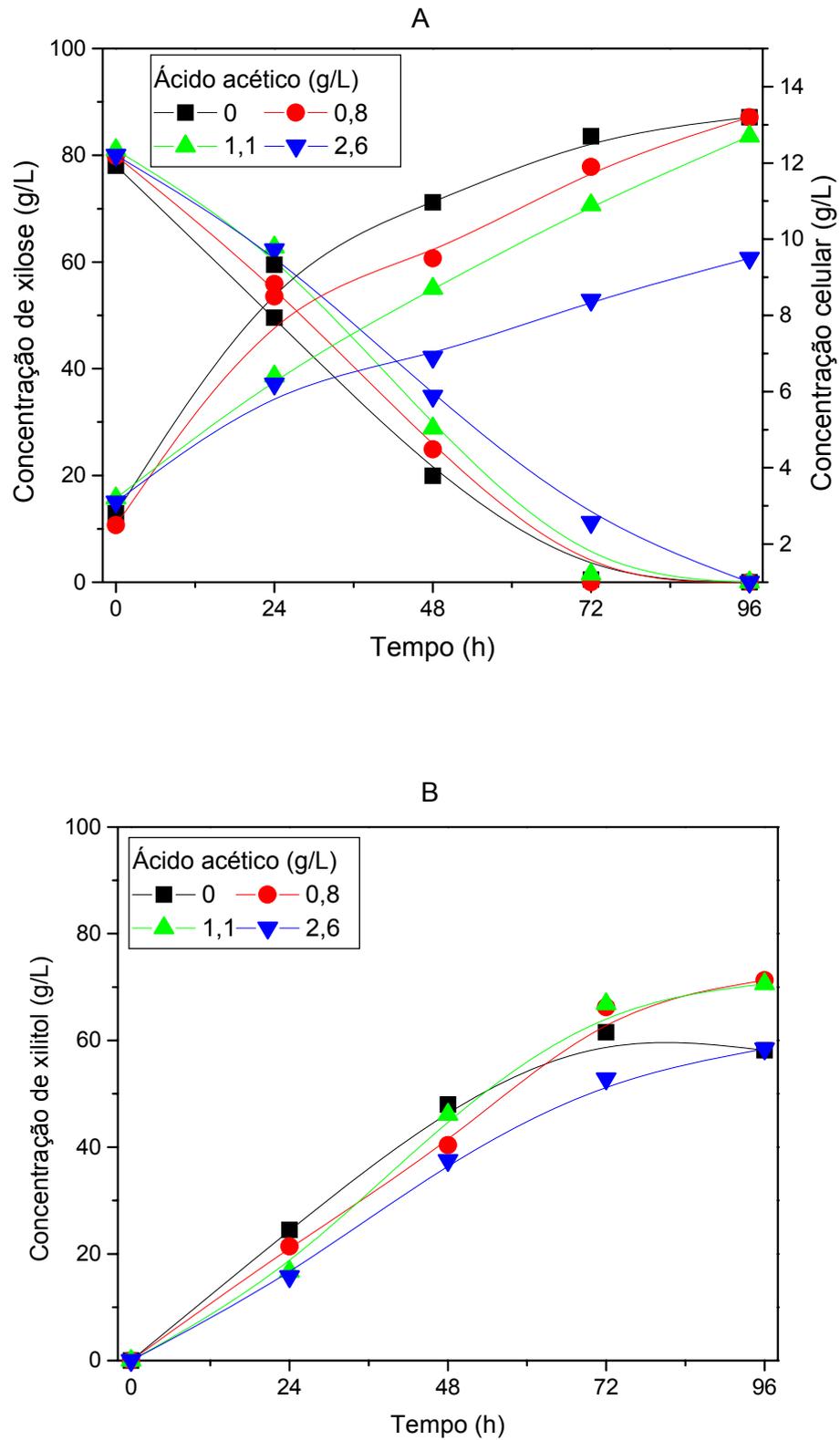
### 5.1. Efeito do Ácido Acético; Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre o Crescimento e a Produção de Xilitol por *C. guilliermondii* em Meio Definido

Com objetivo de se estudar o efeito inibitório do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, experimentos foram realizados em meios definidos contendo xilose na concentração de 80 g/L. Os meios foram tamponados com sais de fosfato de potássio para a manutenção do pH próximo de 5,5 unidades, controlando assim potenciais efeitos sinérgicos, capazes de mascarar as variáveis de respostas observadas (crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol). O tipo e a concentração máxima de cada composto avaliado neste estudo foram baseados nos níveis encontrados no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido por hidrólise ácida (CORTEZ, 2005).

#### 5.1.1 Ácido Acético

O ácido acético é o principal ácido alifático presente nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal. Sua concentração depende do tipo de biomassa empregada e do processo de hidrólise utilizado, podendo variar de 0,6 g/L a 12 g/L (FENSKE; GRIFFIN; PENNER, 1998; MUSSATTO; ROBERTO, 2006; TRAN; CHARMLERS, 1985; PEREGO *et al.*, 1990; WATSON; PRIOR; LATEGAN, 1984). Os níveis de tolerância dos microrganismos ao ácido acético também variam com a espécie e com as condições de cultivo empregadas (FELIPE *et al.*, 1997, HELLE *et al.*, 2003).

A Figura 5.1 mostra o efeito do ácido acético (0,8 a 2,6 g/L) sobre o crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol por *C. guilliermondii*. Observa-se que o crescimento celular decresceu com o aumento da concentração de ácido acético no meio, enquanto que o consumo de xilose e a produção de xilitol foram afetados apenas quando a concentração do ácido acético foi de 2,6 g/L (Figura 5.1 A e B). Com 2,6 g/L de ácido acético a redução na concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol foi de 30, 13 e 18%, respectivamente, após 72 horas, quando comparado ao controle (meio sem adição de ácido acético).



**Figura 5.1.** Cinética do crescimento celular e consumo de xilose (A) e produção de xilitol (B) por *C. guilliermondii* em meio definido suplementado com 0,8, 1,1 e 2,6 g/L de ácido acético.

Em fermentações de meio definido contendo 55 g/L de xilose empregando a mesma levedura, Felipe *et al.* (1995) também constataram um decréscimo no crescimento celular (30%) e no consumo de xilose (20%) em meios suplementados com 3 g/L de ácido acético, após 68 horas de fermentação. Entretanto, este mesmo comportamento não foi observado para a produção de xilitol, uma vez que a concentração deste poliálcool em meio adicionado de 3 g/L de ácido acético foi similar ao obtido em meio ausente do inibidor.

O efeito de inibição do crescimento celular de *C. guilliermondii*, durante o processo de bioconversão de xilose em xilitol foi também observado por Silva *et al.* (2004) em fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Neste trabalho foi constatada uma redução de 17% no crescimento celular quando o meio de fermentação foi suplementado com 2 g/L de ácido acético. Segundo os autores, provavelmente a inibição está relacionada com interferências, induzidas pelo ácido acético, no transporte de xilose através da membrana celular, ou pelo desvio de ATP requerido para o crescimento celular para prevenir a acidificação do pH intracelular.

Para uma análise geral dos resultados foram determinados os parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em meios contendo diferentes concentrações de ácido acético (Tabela 5.1). Observa-se que dentre os parâmetros fermentativos avaliados, o efeito do ácido acético foi mais pronunciado sobre o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), que decresceu de 0,09 g/g para 0,06 g/g (redução de 33%) quando o meio foi suplementado com 2,6 g/L deste ácido. Para a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) e para o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) esta redução foi de 16% e 5%, respectivamente.

**Tabela 5.1.** Efeito do ácido acético sobre os parâmetros fermentativos da produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii*, em meio definido, após 72 h de cultivo.

Ensaio	Ácido acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/Lh)
1	0,0	0,09	0,81	0,87
2	0,8	0,10	0,83	0,92
3	1,1	0,08	0,84	0,93
4	2,6	0,06	0,77	0,73

Com base nos resultados obtidos podemos inferir que, nas condições experimentais avaliadas, a presença de ácido acético até a concentração 1,1 g/L no meio de fermentação não afeta a produção de xilitol por *C. guilliermondii*, entretanto na concentração de 2,6 g/L, o ácido se torna tóxico para a célula reduzindo o seu crescimento e afetando negativamente a produção de xilitol.

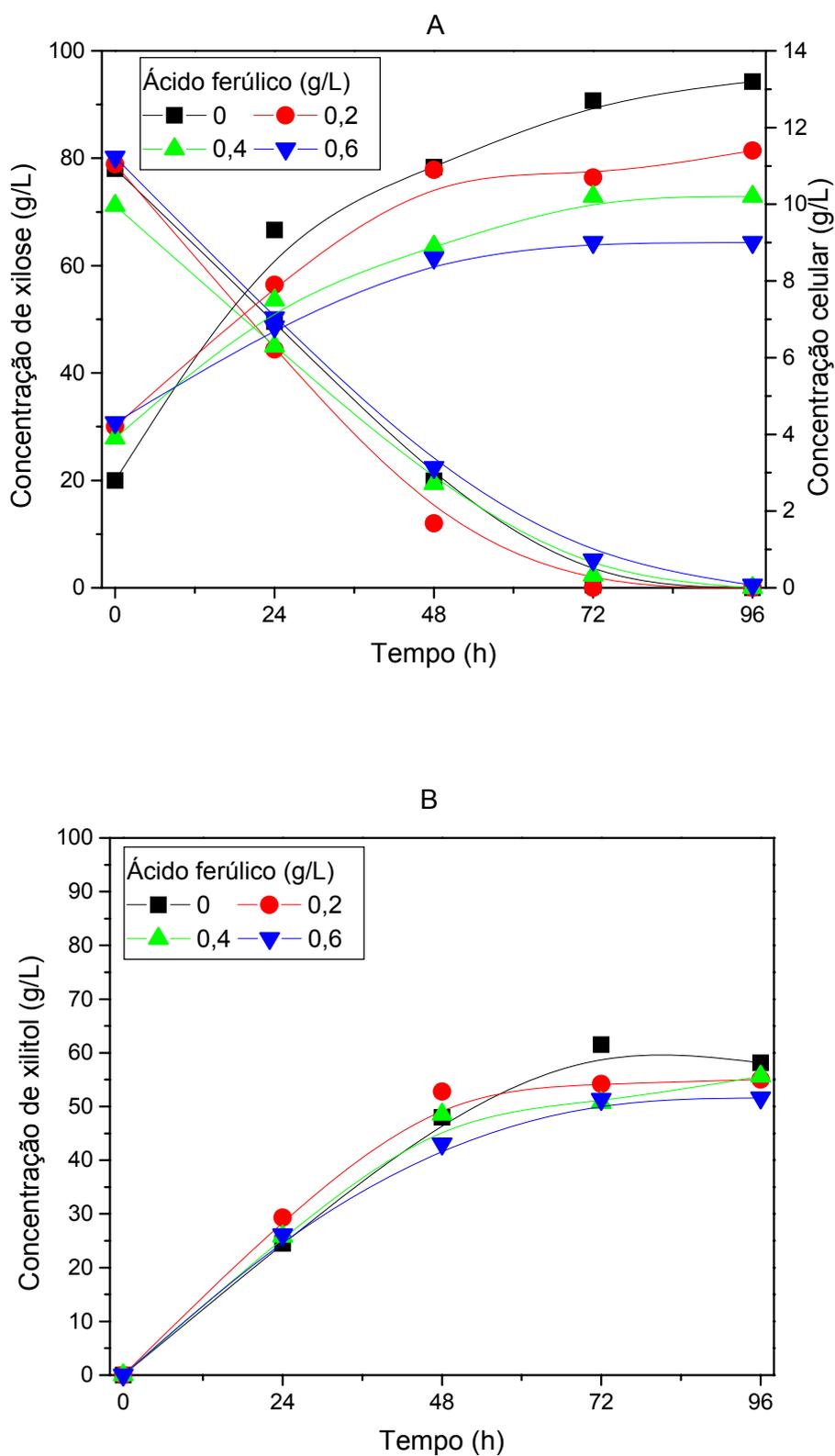
### 5.1.2. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico constitui um ácido aromático presente na parede celular de vários resíduos agrícolas. Normalmente, este ácido é liberado durante o processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos devido à degradação parcial da lignina (ANDO *et al.*, 1986). O ácido ferúlico tem sido identificado e quantificado em diferentes tipos de hidrolisados, sendo sua concentração dependente do tipo de biomassa vegetal utilizada e do processo de hidrólise empregado (MARTIN *et al.*, 2002, LUO *et al.*, 2002).

Para avaliar a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* frente a diferentes concentrações de ácido ferúlico, ensaios foram realizados em meio definido contendo cerca de 80 g/L de xilose suplementado com 0,2, 0,4 e 0,6 g/L deste ácido. Os resultados obtidos, em termos de crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol foram comparados ao ensaio controle, onde não foi adicionado o ácido em estudo.

Observa-se na Figura 5.2 A que o crescimento celular foi menor à medida que a concentração do ácido foi aumentada, sendo constatada uma redução de aproximadamente 30%, após 72 h de fermentação, quando a concentração do ácido foi de 0,6 g/L. Por outro lado, o consumo de xilose não foi influenciado pela presença do ácido ferúlico em nenhuma das concentrações avaliadas, uma vez que os perfis cinéticos de assimilação do substrato foram semelhantes ao do ensaio controle. Porém, a produção de xilitol apresentou uma modesta redução (em torno de 15%) em relação ao controle, quando o meio continha 0,6 g/L de ácido ferúlico (Figura 5.2 B).

Borneman *et al.* (1989), estudaram o efeito do ácido ferúlico sobre o crescimento de 4 cepas de bactérias pertencentes à microbiota estomacal de ruminantes (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flaveaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Lachnospira multiparus*), devido à sua resistência a compostos



**Figura 5.2.** Cinética do crescimento celular e consumo de xilose (A) e produção de xilitol (B) por *C. guilliermondii* em meio definido suplementado com 0,2, 0,4 e 0,6 g/L de ácido ferúlico.

fenólicos como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, encontrados neste habitat. Os resultados demonstraram que dentre as 4 cepas testadas, apenas a cepa *R. albus* foi inibida (37%) pela presença de 1,43 g/L de ácido ferúlico. Estudando o efeito de ácidos fenólicos sobre o metabolismo de *Lactobacillus plantarum*, Barthelmebs *et al.* (2001) constataram que ácido ferúlico em concentração de 0,17 g/L não interferiu no crescimento desta espécie, entretanto, quando presente em concentrações maiores que 0,4 g/L, este ácido proporcionou um aumento na fase lag, sem afetar a concentração final de biomassa.

O efeito do ácido ferúlico da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* nos parâmetros fermentativos pode ser visualizados pelos resultados apresentados na Tabela 5.2. Verifica-se nesta Tabela que a adição de 0,2 e 0,4 g/L de ácido ferúlico ao meio de cultivo, promoveu uma modesta inibição (variação de 10 a 22%) nos valores dos parâmetros fermentativos avaliados. Com o aumento da concentração de ácido ferúlico para 0,6 g/L, apenas o fator de conversão de xilose em células ( $Y_{X/S}$ ), apresentou um decréscimo acentuado (44%) quando comparado ao controle (ensaio 1). Nestas condições, a produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) foram reduzidos em 18% e 16%, respectivamente.

**Tabela 5.2.** Efeito do ácido ferúlico sobre os parâmetros fermentativos da produção de xilitol pela levedura de *C. guilliermondii* em meio definido, após 72 h de cultivo.

Ensaio	Ac. ferúlico (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/L.h)
1	0,0	0,09	0,81	0,87
2	0,2	0,07	0,69	0,75
3	0,4	0,08	0,73	0,70
4	0,6	0,05	0,68	0,71

A influência de vários compostos aromáticos sobre os parâmetros da fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada por Larsson *et al.* (2000). Estes autores testaram três concentrações de ácido ferúlico (0,02, 0,2 e 1,0 g/L) e compararam os resultados com o ensaio controle. Foi constatado que o ácido ferúlico na concentração de 0,02 g/L não apresentou influência sobre os

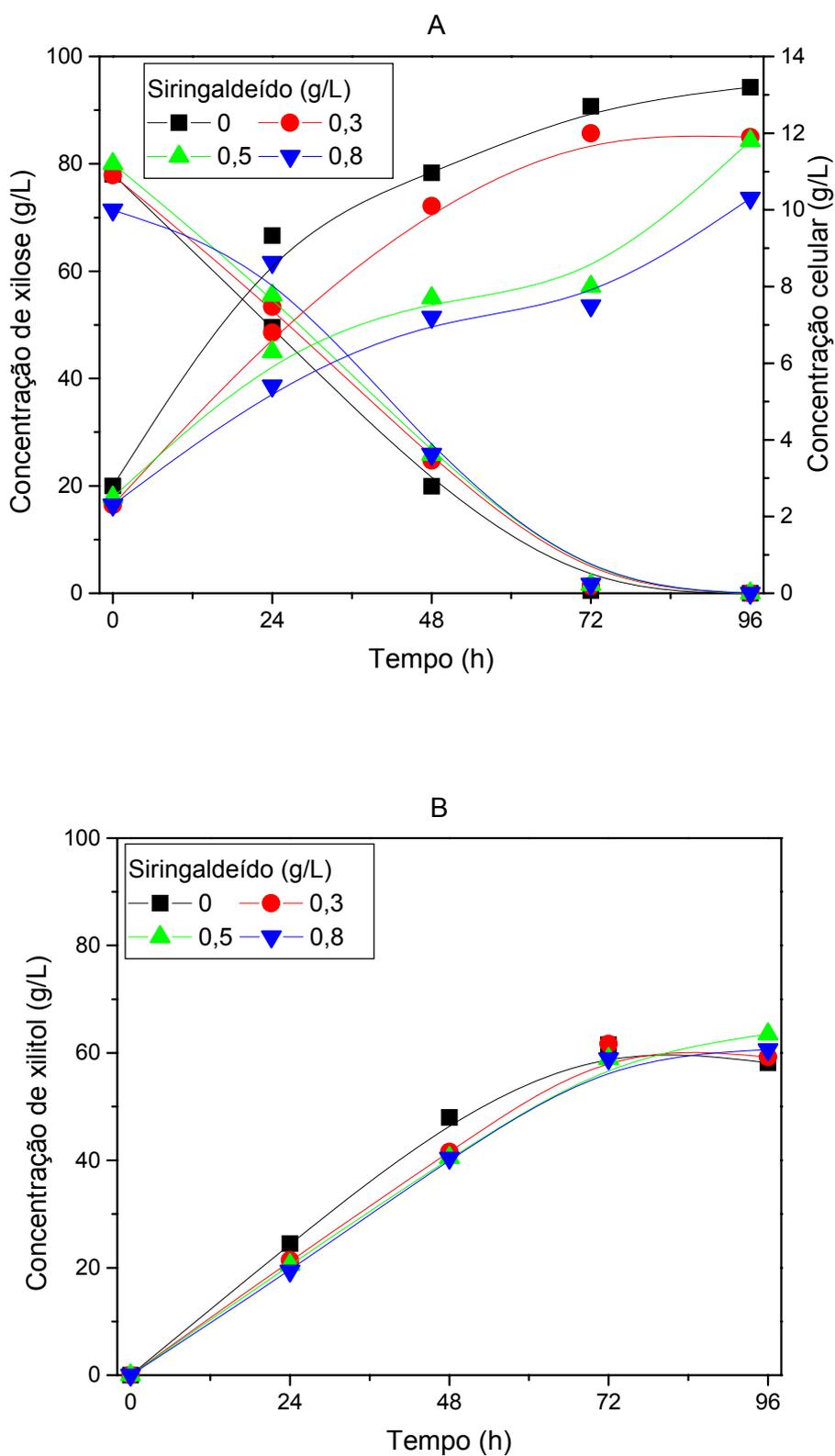
parâmetros fermentativos avaliados. Entretanto, com o aumento da concentração do ácido para 0,2 e 1,0 g/L, a produtividade volumétrica em etanol foi reduzida em 54% e 80%, respectivamente e o fator de conversão de substrato em células em 17% e 90%, respectivamente, quando comparados ao controle. Foi ainda observado que para todas as concentrações de ácido ferúlico testadas, o fator de conversão de substrato em etanol não foi afetado. Estes resultados sugerem que o aumento na concentração de ácido ferúlico afetou prioritariamente o rendimento em biomassa, o que conseqüentemente influenciou negativamente os valores de produtividade volumétrica. Tais observações corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, onde o ácido ferúlico exerceu um efeito de inibição mais pronunciado sobre o crescimento celular do que sobre a conversão de xilose em xilitol.

### 5.1.3 Siringaldeído

Assim como o ácido ferúlico, o siringaldeído é um composto aromático, normalmente liberado durante o processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos devido à degradação parcial da lignina (ANDO *et al.*, 1986; TRAN; CHAMBERS, 1986). Sua concentração é também dependente do tipo de biomassa vegetal utilizada e do processo de hidrólise empregado (MARTÍN *et al.*, 2002, LUO *et al.*, 2002).

O efeito do siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol, por *C. guilliermondii*, foi avaliado em meio definido suplementado com 0,3, 0,5 e 0,8 g/L deste aldeído. Os resultados obtidos referentes ao crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol foram comparados ao ensaio controle, onde não foi adicionado o siringaldeído.

Observa-se na Figura 5.3 A que o crescimento celular foi inibido em concentrações de siringaldeído acima de 0,3 g/L, sendo constatada, após 72 h de cultivo, uma redução de aproximadamente 36% na formação de biomassa quando o meio foi suplementado com 0,5 ou 0,8 g/L de siringaldeído. Comportamento semelhante foi verificado por Duarte *et al.* (2005) durante o cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* em meio definido contendo 15 g/l de xilose como fonte de carbono. Segundo estes autores, o crescimento celular foi reduzido em torno de 42% nas primeiras 24 h, quando o meio continha 0,75 g/L de siringaldeído.



**Figura 5.3.** Cinética do crescimento celular e consumo de xilose (A) e produção de xilitol (B) por *C. guilliermondii* em meio definido suplementado com 0,3, 0,5 e 0,8 g/L de siringaldeído.

Ao contrário do crescimento celular, o consumo de xilose (Figura 5.3 A) e produção de xilitol (Figura 5.3 B), não foram influenciados pela concentração de siringaldeído no meio de cultivo, os quais apresentaram perfis cinéticos semelhantes ao do controle, para todas as concentrações do aldeído avaliadas.

O efeito inibitório do siringaldeído sobre o metabolismo de microrganismos assimiladores de xilose tem sido investigado por outros pesquisadores. Zaldivar *et al.* (1999) estudando a toxicidade do siringaldeído sobre o crescimento de *Escherichia coli* LY01 a partir de xilose, constataram que a concentração deste aldeído necessária para inibir o crescimento celular foi de 2,5 g/L. Delgenes *et al.* (1996) também observaram uma pronunciada inibição no crescimento e produção de etanol pelas leveduras *Candida shehatae* e *Pichia stipitis*, quando o meio de fermentação foi suplementado com 1,5 g/L de siringaldeído.

O mecanismo de inibição dos compostos fenólicos sobre o metabolismo microbiano não está totalmente esclarecido na literatura. De acordo com Utree *et al.* (2002) e Duarte *et al.* (2005), o efeito antimicrobiano destes compostos pode ser atribuído à sua hidrofobicidade, o que afeta a integridade da membrana celular, provocando um colapso no potencial osmótico e no controle enzimático e interrompendo, desta forma, a síntese de ATP e finalmente levando a morte celular.

No presente trabalho ficou demonstrado que o siringaldeído, nas concentrações avaliadas, não afeta o consumo de xilose e a produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii*. Porém, concentrações deste composto acima de 0,3 g/L inibem o crescimento deste microrganismo.

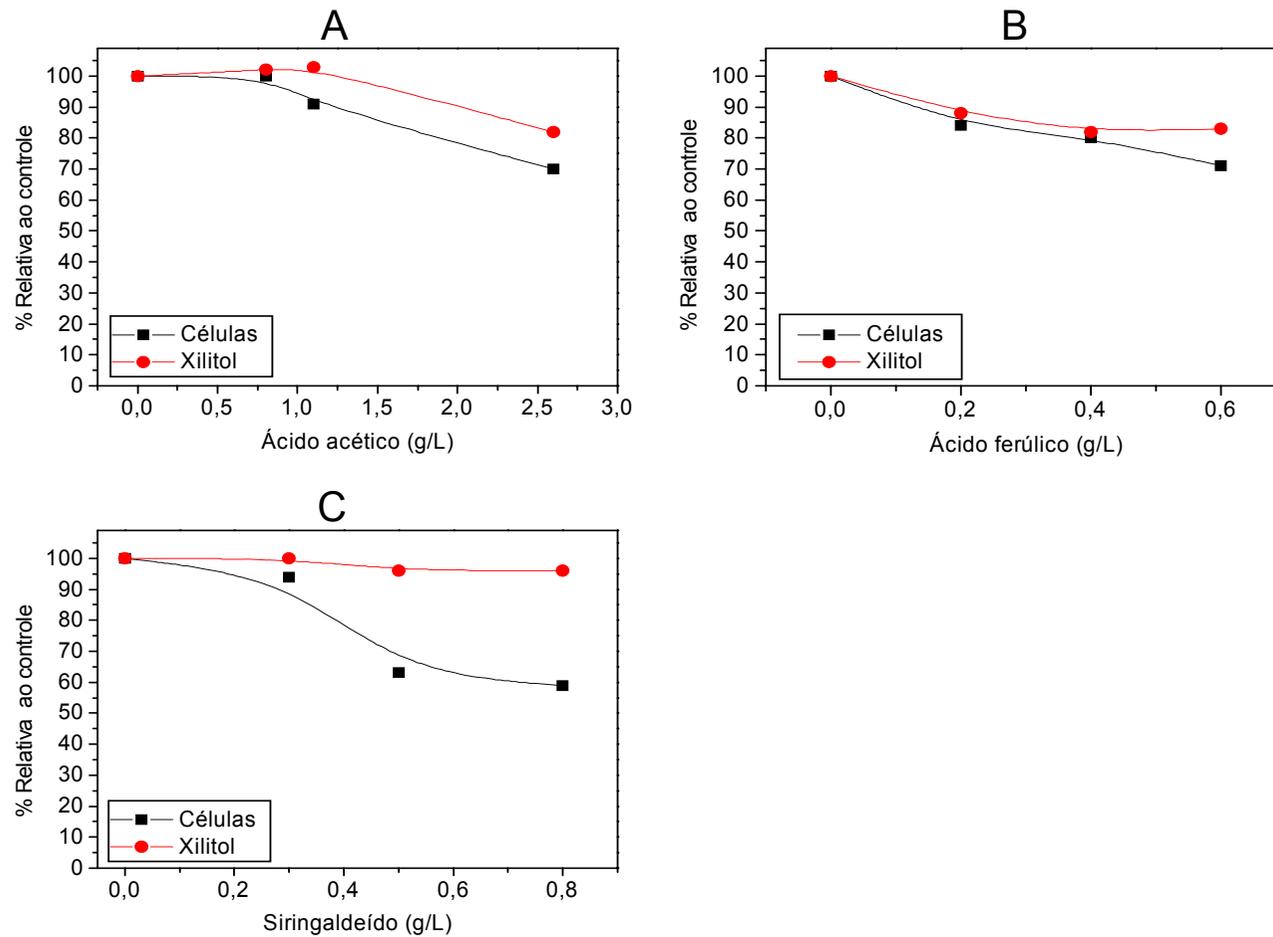
O efeito do siringaldeído nos parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 5.3. Observa-se que o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) não sofreram variações acentuadas (<10%) com a adição do aldeído aromático. Entretanto, observa-se uma redução de 0,09 para 0,06 g/g (33%) no fator de conversão de xilose em células quando os meios foram suplementados com 0,5 e 0,8 g/L de siringaldeído.

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que as concentrações de 0,5 e 0,8 g/L de siringaldeído, nas condições experimentais avaliadas, afetam a formação de biomassa, mas não interfere no consumo de xilose e na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*.

**Tabela 5.3.** Efeito do siringaldeído sobre os parâmetros fermentativos da produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* em meio definido, após 72 h de cultivo.

Ensaio	Siringaldeído (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/L.h)
1	0,0	0,09	0,81	0,87
2	0,3	0,10	0,80	0,85
3	0,5	0,06	0,75	0,81
4	0,8	0,06	0,84	0,81

A Figura 5.4 mostra o efeito inibitório do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído, sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*. Observa-se que para todos os compostos estudados, a inibição sobre o crescimento celular foi muito mais acentuada do que sobre a biossíntese de xilitol. A maior porcentagem de redução no crescimento celular (49%) foi causada pelo siringaldeído na concentração de 0,8 g/L, seguido pelo ácido acético e ferúlico (30%) na concentração de 2,6 e 0,6 g/L, respectivamente. A produção de xilitol também foi inibida em presença destes compostos, porém com menor intensidade atingindo valores de aproximadamente 18%, para os ácidos acético e ferúlico nas concentrações de 2,6 e 0,8 g/L, respectivamente. Por outro lado, nas concentrações estudadas, o siringaldeído não afetou (<10%) a produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii*. Estes resultados demonstram que nas condições avaliadas, os ácidos, acético e ferúlico atuam como inibidores da bioprodução de xilitol, enquanto que o siringaldeído não interfere neste processo.



**Figura 5.4.** Efeito do ácido acético (A), ácido ferúlico (B) e siringaldeído (C) sobre o crescimento e produção de xilitol por *C. guillermondii*, após 72 horas de cultivo em meio definido.

## 5.2. Influência do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol empregando a metodologia do planejamento experimental

Os planejamentos fatoriais têm sido amplamente utilizados na otimização de processos fermentativos, devido à possibilidade de analisar simultaneamente diversos fatores, bem como, verificar os efeitos individuais de cada uma delas e de suas interações (ROBERTO *et al.*, 1995).

Nesta etapa, os experimentos foram conduzidos de acordo com a metodologia do planejamento experimental de forma a identificar e quantificar o efeito individual do ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI) e de suas interações sobre o bioprocesso de produção de xilitol. Os ensaios foram realizados em meios definidos tamponados ou não, para avaliar o efeito das variáveis em meios com e sem manutenção do pH. A matriz com os níveis reais das variáveis e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5.5. Observa-se nesta tabela que para os meios não tamponados, o pH final variou com a condição do experimento. O pH decresceu de 5,5 para aproximadamente 3,0 em meios ausentes de ácido acético, enquanto que nos meios adicionados deste ácido, os valores de pH decresceram de forma menos acentuada atingindo valores de aproximadamente 4,0. A redução no pH inicial em meios não tamponados está associada à liberação de ácidos livres devido ao consumo da amônia pela levedura (VOGEL; TADARO, 1997).

No presente trabalho, a redução do pH na presença de ácido acético não foi tão expressiva, o que demonstra o poder tamponante deste ácido na faixa de pH de 5,0 a 5,5. Este efeito foi também observado por Palmqvist *et al.* (1999) durante o cultivo de *S. cerevisiae* em meio definido. Os autores verificaram uma redução de 2,8 unidades no pH em meios ausentes do ácido acético, enquanto que na presença deste ácido o pH variou menos de 1,0 unidade. Para auxiliar na análise do planejamento, foram construídos gráficos de barras para expressar os resultados em termos de crescimento celular, produção de xilitol e dos parâmetros fermentativos  $Q_P$  e  $Y_{P/S}$  obtidos nas condições experimentais avaliadas (Figuras 5.5 e 5.6).

**Tabela 5.4.** Resultados da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* obtidos no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para a avaliação do efeito do ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI) sobre o bioprocesso.

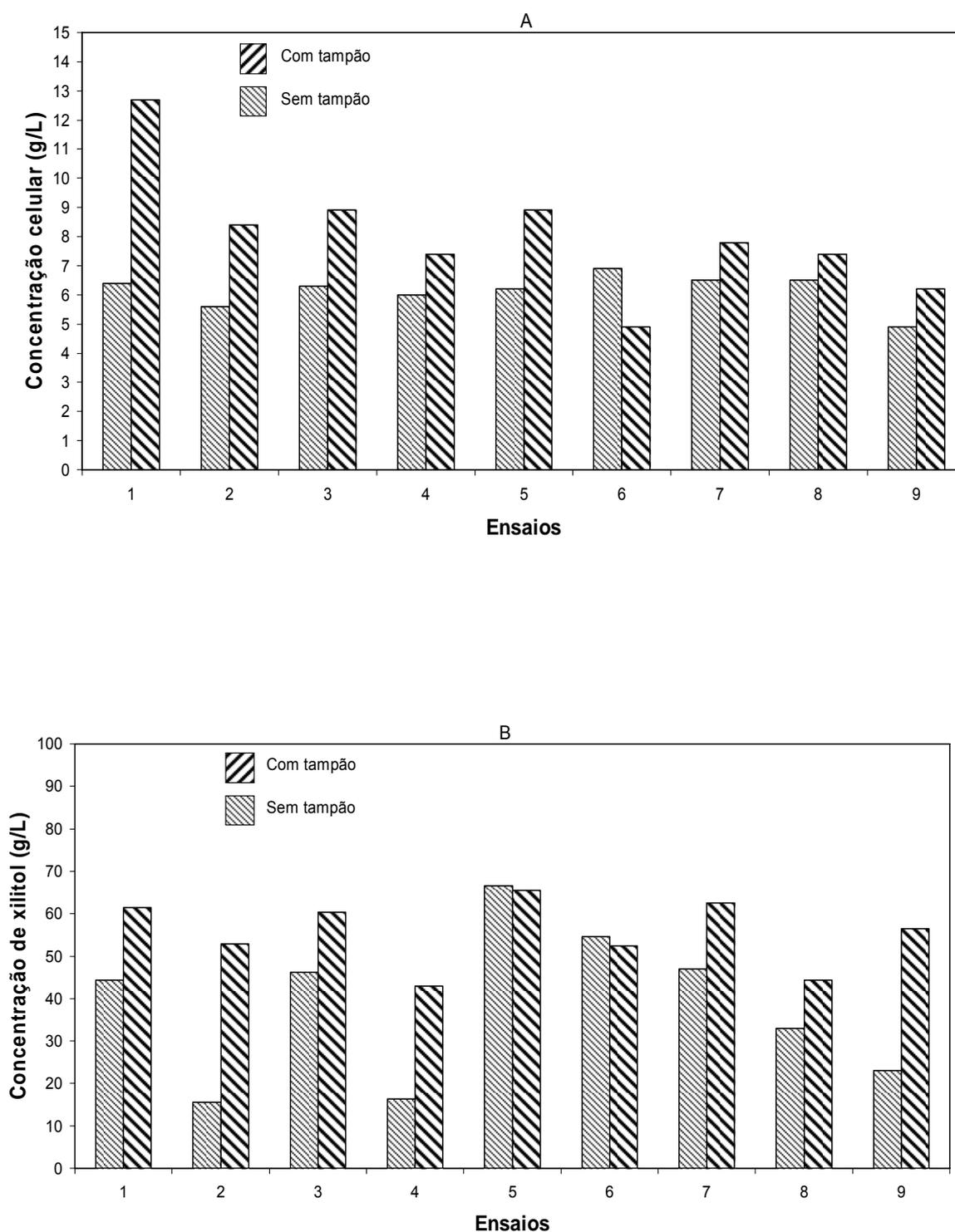
Ensaio	Variáveis <sup>a</sup>			pH <sub>final</sub>	X <sub>final</sub> (g/L)	C <sub>XI</sub> (%)	P <sub>XO</sub> (g/L)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	Q <sub>P</sub> (g/Lh)
	AA	AF	SI							
1	0	0	0	5,7	12,7	98	61,5	0,09	0,81	0,87
1*	0	0	0	2,7	6,4	74	44,4	0,04	0,73	0,62
2	2,6	0	0	5,2	8,4	86	52,9	0,06	0,77	0,73
2*	2,8	0	0	4,4	5,6	62	15,5	0,04	0,31	0,21
3	0	0,6	0	5,2	8,9	87	60,3	0,06	0,72	0,83
3*	0	0,6	0	3,1	6,3	87	46,2	0,04	0,67	0,64
4	2,6	0,6	0	5,2	7,4	64	43,0	0,06	0,76	0,59
4*	2,6	0,6	0	4,4	6,0	62	16,4	0,04	0,33	0,23
5	0	0	0,8	5,5	8,9	86	65,5	0,07	0,83	0,91
5*	0	0	0,8	2,9	6,2	99	66,5	0,03	0,84	0,92
6	2,5	0	0,8	5,5	4,9	79	52,4	0,02	0,71	0,72
6*	2,6	0	0,8	3,8	6,9	89	54,6	0,04	0,77	0,76
7	0	0,6	0,8	5,2	7,8	79	62,5	0,06	0,85	0,86
7*	0	0,6	0,8	3,6	6,5	77	47,0	0,04	0,77	0,65
8	2,7	0,6	0,8	5,2	7,4	59	44,3	0,07	0,86	0,61
8*	2,7	0,6	0,8	4,8	6,5	66	33,0	0,05	0,63	0,46
9	1,7	0,3	0,4	5,1	6,2	81	56,5	0,04	0,75	0,78
9*	1,6	0,3	0,4	4,1	4,9	59	23,0	0,03	0,49	0,32
10	1,8	0,3	0,4	5,3	6,4	79	59,3	0,04	0,79	0,82
10*	1,7	0,3	0,4	4,1	4,0	58	22,6	0,01	0,48	0,31
11	1,8	0,3	0,4	5,3	6,9	81	50,8	0,04	0,67	0,70
11*	1,7	0,3	0,4	3,9	5,9	61	24,7	0,04	0,51	0,34

<sup>a</sup> valores em g/L; Concentração inicial média de glicose: 15,0 ± 3,0 g/L, xilose: 85,0 ± 9,0 g/L; pH inicial 5,4 ± 0,4; \* Meio definido sem o uso do tampão. Parâmetros calculados com 72 horas.

A Figura 5.5 apresenta os resultados referentes ao crescimento celular e produção de xilitol por *C. guilliermondii* conforme as condições descritas no planejamento experimental proposto. Observa-se na Figura 5.5 A, que em praticamente todas as condições avaliadas, a formação de biomassa foi favorecida nos meios tamponados (pH controlado). O desfavorecimento do crescimento celular em meios não tamponados pode ser atribuído a queda do pH. De acordo com Brett *et al.* (2005) a redução do pH provoca a quebra da homeostase celular, afetando a bomba de H<sup>+</sup> da ATPase e conseqüentemente interferindo na manutenção do metabolismo celular.

Com relação à produção de xilitol (Figura 5.5 B), nota-se um comportamento similar ao observado para o crescimento celular, ou seja, a concentração de xilitol nos meios tamponados foi superior às obtidas em meios não tamponados, exceto para os ensaios 5 e 6, onde a concentração de xilitol não foi afetada pelo decréscimo do pH no meio não tamponado.

Observa-se também na Figura 5.5 B que os maiores valores de concentração de xilitol (70 e 66 g/L) foram obtidos nos ensaios 1 (controle) e 5 (suplementado com 0,8 g/L de siringaldeído), respectivamente. Estes resultados sugerem que nas condições experimentais avaliadas, o siringaldeído não possui ação inibitória sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii*. Outro dado importante observado na Figura 5.5 B, é a baixa produção de xilitol (<20 g/L) em meios não tamponados contendo ácido acético (ensaios 2) ou uma combinação deste ácido com o ácido ferúlico (ensaio 4). Estes resultados sugerem que o ácido ferúlico não apresenta efeito sobre a formação de xilitol. De fato, em meio não tamponado contendo apenas o ácido ferúlico (ensaio 3), a produção de xilitol foi similar à obtida no ensaio 1 (controle), em torno de 45 g/L. Ainda com relação ao efeito do ácido acético (ensaio 2), nota-se que a concentração de xilitol foi aumentada de 15,5 g/L para 46,2 g/L, quando o meio de fermentação foi tamponado. Tais observações confirmam que o efeito tóxico do ácido acético é potencializado com o decréscimo do pH da fermentação.

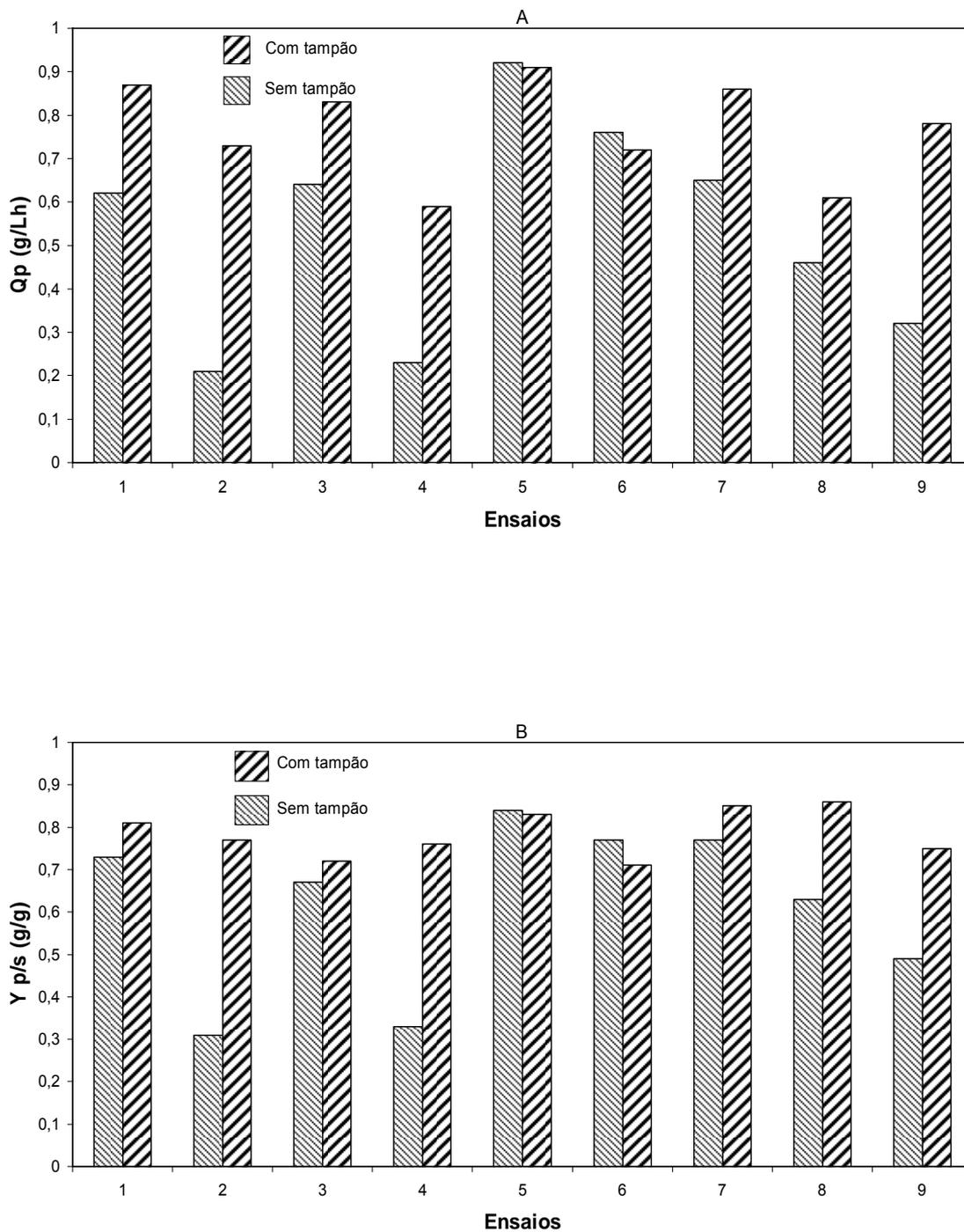


**Figura 5.5.** Crescimento celular (A) e produção de xilitol (B) por *C. guilliermondii* em meio definido conforme as condições descritas no planejamento experimental 2<sup>3</sup>.

A Figura 5.6 mostra os resultados referentes à produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ). Semelhante ao observado para a concentração de xilitol, os maiores valores de produtividade em xilitol (0,87 e 0,91 g/L.h), foram obtidos nos ensaios 1 (controle) e 5 (adicionado de 0,8 g/L de siringaldeído), respectivamente, em meios tamponados, enquanto que as menores produtividades volumétricas (0,21 e 0,23 g/L.h) foram obtidas em meios não tamponados, suplementados apenas com ácido acético (ensaio 2) ou com os ácidos acético e ferúlico (ensaio 4).

Com relação ao fator de conversão de xilose em xilitol (Figura 5.6 B) verifica-se que os maiores valores deste parâmetro ( $>0,80$  g/g) foram obtidos nos ensaios 5, 7 e 8, para os meios tamponados e no ensaio 5, para os meios não tamponados. Vale a pena destacar que, o consumo de xilose nestes ensaios variou com as condições experimentais empregadas, o que conseqüentemente afetou a produção de xilitol (Tabela 5.4). Por exemplo, no ensaio 5, onde o meio continha apenas o siringaldeído como inibidor, o consumo de xilose foi quase total após 72 h, independentemente do tamponamento do meio, o que demonstra não haver inibição da biossíntese por este composto. Por outro lado, na presença de ácido ferúlico e siringaldeído (ensaio 7), o consumo de xilose foi de 78% em média e decresceu para aproximadamente 63%, quando o meio foi suplementado com os três inibidores estudados (ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído). Lohmeier-Vogel *et al.* (1998) avaliando o efeito de inibição do acetato (10,9 g/L), furfural (0,3 g/L) e hidroximetilfurfural (0,9 g/L), sobre a assimilação de xilose para a produção de etanol por *Pachysolen tannophilus*, observou que individualmente os compostos testados não promoveram alteração no consumo de xilose, entretanto, quando os três compostos foram adicionados ao mesmo tempo, a assimilação desta pentose foi reduzida em 50%.

Ainda na Figura 5.6 B, assim como foi observado para a produtividade volumétrica, o fator de conversão de xilose em xilitol também apresentou os menores valores (em torno de 0,30 g/g) nos ensaios 2 e 4, caracterizados pela presença do ácido acético ou de sua combinação com ácido ferúlico em meios não tamponados.



**Figura 5.6.** Produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) por *C. guilliermondii* em meio definido conforme as condições descritas no planejamento experimental  $2^3$ .

Os efeitos individuais e de interação das variáveis (ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído) sobre os parâmetros da bioconversão de xilose em xilitol foram analisados estatisticamente. Os resultados referentes à produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), fator de conversão de xilose em células ( $Y_{X/S}$ ), e o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ), mostrados na matriz do planejamento (Tabela 5.4) foram utilizados como respostas.

As estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste  $t$  (teste de Student) para as três respostas em estudo, estão apresentados nas Tabelas 5.5 a 5.10. Os resultados da análise estatística confirmaram o que havia sido observado pela análise direta dos dados e não indicaram a existência de efeitos de interação entre as variáveis para as respostas estudadas.

Como pode ser visto nas Tabelas 5.5, 5.6 e 5.7 e Figura 5.7, em fermentações conduzidas em meios tamponados, apenas a produtividade volumétrica em xilitol foi influenciada pelos níveis das variáveis (AA) e (AF). Os efeitos principais destas variáveis foram negativos e apresentaram valores de -0,205 para o ácido acético e de -0,085 para ácido ferúlico. Estes resultados revelam que, nas concentrações avaliadas, a produção de xilitol é inibida em maior grau pelo ácido acético do que pelo ácido ferúlico.

Para os meios não tamponados (Tabelas 5.8 a 5.10) verifica-se que apenas o fator de conversão de xilose em células ( $Y_{X/S}$ ) não foi afetado pelos níveis das variáveis estudadas. Conforme mostrados nas Tabelas 5.9 e 5.10, para as respostas fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica em xilitol, ( $Q_P$ ), respectivamente, as variáveis ácido acético (AA) e siringaldeído (SI) apresentaram efeitos principais significativos. O efeito do AA sobre o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) foi negativo (-0,242), enquanto que o efeito do SI foi da mesma magnitude, porém com sinal positivo (+0,242). Estes resultados revelam que a conversão de xilose em xilitol é aumentada em 0,242 g/g com a adição de 0,8 g/L de siringaldeído no meio, enquanto que na presença de 2,6 g/L de ácido acético o decréscimo médio deste parâmetro foi de 0,242 g/g. É interessante ressaltar que o efeito negativo do ácido acético foi anulado pela presença de siringaldeído no meio de fermentação (Figura 5.8 A). Este mesmo comportamento pode ser observado para a produtividade volumétrica em xilitol (Tabela 5.10 e Figura 5.8 B). Quando o meio foi suplementado com 0,8 g/L de SI, ocorreu um aumento

médio de 0,272 g/l.h nos valores de  $Q_p$ , enquanto que o ácido acético na concentração de 2,6 g/L promoveu um decréscimo médio de 0,292 g/L.h sobre este parâmetro.

**Tabela 5.5.** Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste  $t$  para a resposta fator de conversão de xilose em células ( $Y_{X/S}$ ) obtida nos ensaios realizados em meios definidos tamponados.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	$t_{(4)}$	$p$
Média	0,055	$\pm 0,005$	11,102	<0,001
Ácido acético (AA)	-0,017	$\pm 0,012$	-1,493	0,209
Ácido ferúlico (AF)	0,002	$\pm 0,012$	0,213	0,841
Siringaldeído (SI)	-0,012	$\pm 0,012$	-1,067	0,346
AA x AF	0,022	$\pm 0,012$	1,920	0,127
AA x SI	-0,002	$\pm 0,012$	-0,213	0,841
AF x SI	0,017	$\pm 0,012$	1,493	0,209

\* Significativo ao nível de 95% de confiança;  $R^2 = 0,70$ .

**Tabela 5.6.** Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste  $t$  para a resposta fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) obtida nos ensaios realizados em meios tamponados.

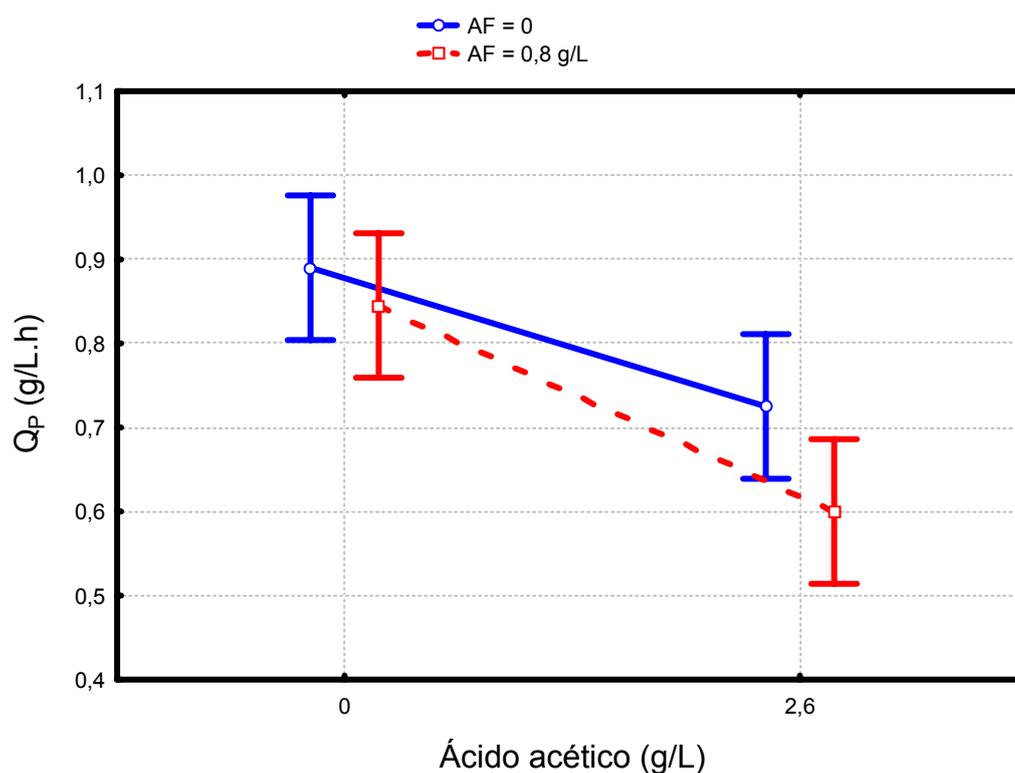
Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	$t_{(4)}$	$p$
Média	0,774	$\pm 0,018$	43,898	<0,001
Ácido acético (AA)	-0,027	$\pm 0,041$	-0,664	0,542
Ácido ferúlico (AF)	0,017	$\pm 0,041$	0,423	0,694
Siringaldeído (SI)	0,047	$\pm 0,041$	1,148	0,314
AA x AF	0,052	$\pm 0,041$	1,268	0,273
AA x SI	-0,027	$\pm 0,041$	-0,664	0,542
AF x SI	0,067	$\pm 0,041$	1,631	0,178

\* Significativo ao nível de 95% de confiança;  $R^2 = 0,62$ .

**Tabela 5.7.** Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste  $t$  para a resposta produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) obtida nos ensaios realizados em meios definidos tamponados.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	$t_{(3)}$	p
Média	0,765	$\pm 0,013$	57,965	<0,001
Ácido acético (AA)	-0,205	$\pm 0,031$	-6,619	0,002*
Ácido ferúlico (AF)	-0,085	$\pm 0,031$	-2,744	0,051*
Siringaldeído (SI)	0,020	$\pm 0,031$	0,645	0,553
AA x AF	-0,040	$\pm 0,031$	-1,291	0,266
AA x SI	-0,015	$\pm 0,031$	-0,484	0,653
AF x SI	0,005	$\pm 0,031$	0,161	0,879

\*Significativo ao nível de 95% de confiança;  $R^2 = 0,93$ .



**Figura 5.7.** Variação da produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) com os níveis das variáveis: ácido acético (AA) e ácido ferúlico (AF), durante a fermentação de *C. guilliermondii* em meio definido tamponado.

**Tabela 5.8.** Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste  $t$  para a resposta fator de conversão de xilose em células ( $Y_{X/S}$ ) obtida nos ensaios realizados em meios definidos não tamponados.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	$t_{(4)}$	p
Média	0,038	$\pm 0,001$	25,065	<0,001
Ácido acético (AA)	0,005	$\pm 0,003$	1,383	0,238
Ácido ferúlico (AF)	0,005	$\pm 0,003$	1,383	0,238
Siringaldeído (SI)	0,000	$\pm 0,003$	0,000	1,000
AA x AF	0,000	$\pm 0,003$	0,000	1,000
AA x SI	0,005	$\pm 0,003$	1,383	0,238
AF x SI	0,005	$\pm 0,003$	1,383	0,238

\* Significativo ao nível de 95% de confiança;  $R^2 = 0,66$ .

**Tabela 5.9.** Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste  $t$  para a resposta fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) obtida nos ensaios realizados em meios definidos não tamponados.

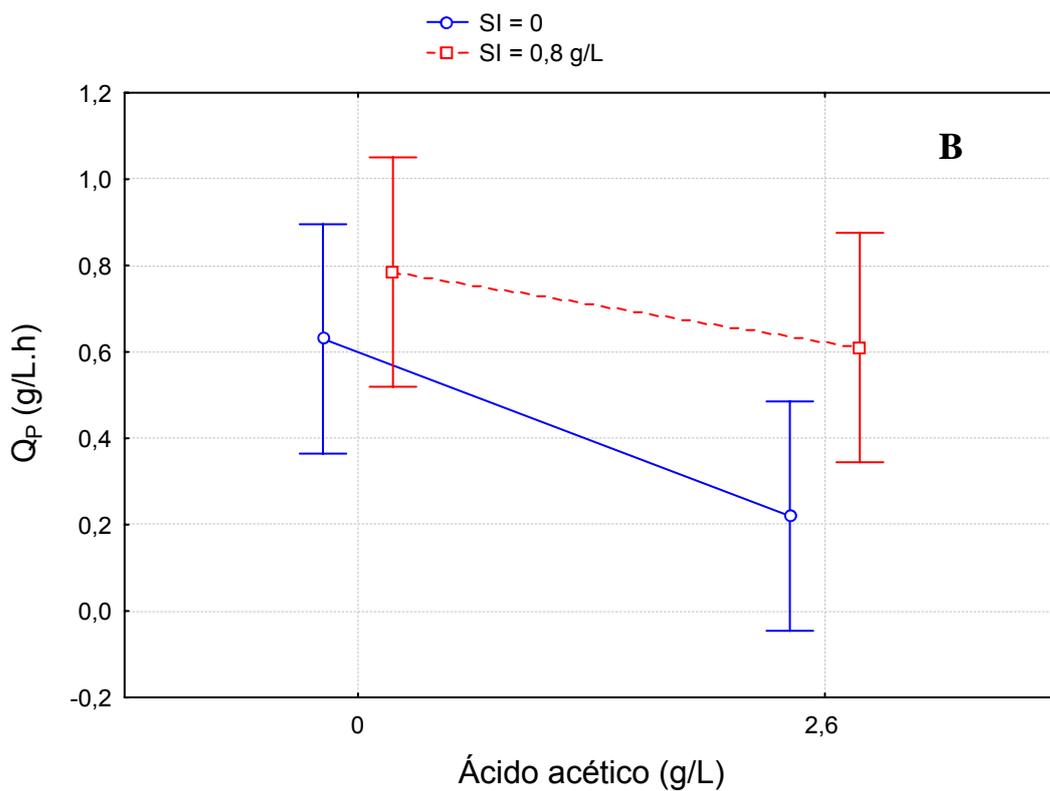
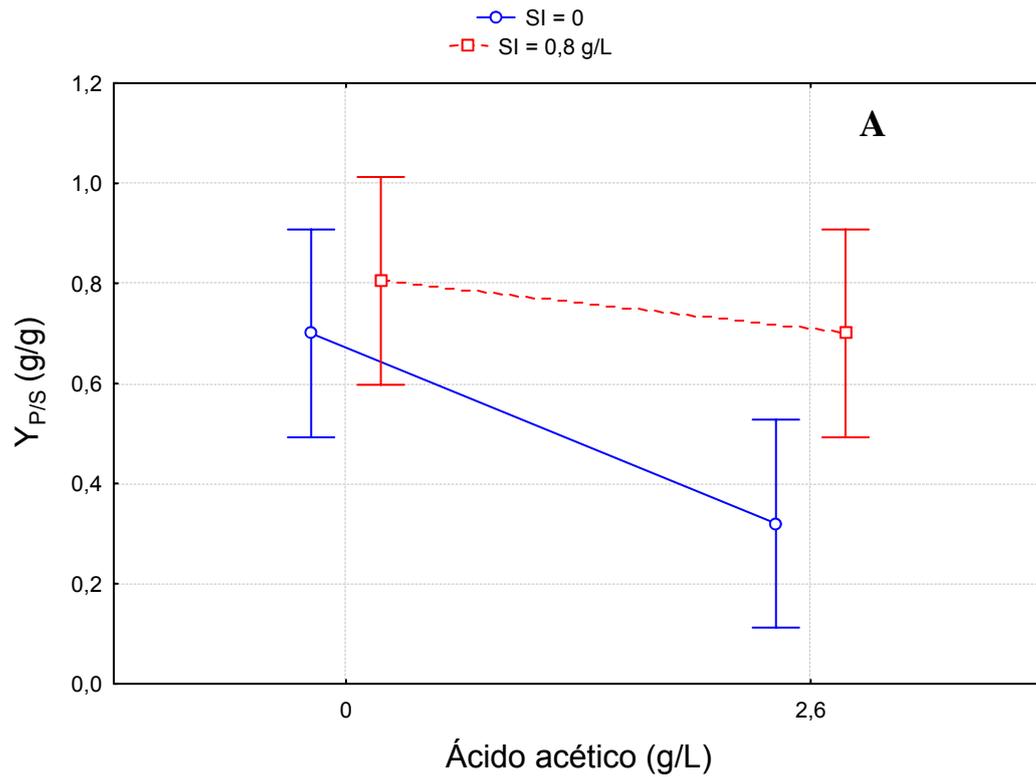
Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	$t_{(4)}$	p
Média	0,593	$\pm 0,031$	18,60	<0,001
Ácido acético (AA)	-0,242	$\pm 0,074$	-3,241	0,031*
Ácido ferúlico (AF)	-0,062	$\pm 0,074$	-0,835	0,450
Siringaldeído (SI)	0,242	$\pm 0,074$	3,241	0,031*
AA x AF	0,002	$\pm 0,074$	0,033	0,974
AA x SI	0,137	$\pm 0,074$	1,837	0,139
AF x SI	-0,042	$\pm 0,074$	-0,568	0,600

\* Significativo ao nível de 95% de confiança;  $R^2 = 0,86$ .

**Tabela 5.10.** Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste  $t$  para a resposta produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) obtida nos ensaios realizados em meios definidos não tamponados.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	$t_{(4)}$	p
Média	0,496	$\pm 0,053$	9,347	<0,001
Ácido acético (AA)	-0,292	$\pm 0,124$	-2,348	0,078**
Ácido ferúlico (AF)	-0,132	$\pm 0,124$	-1,063	0,347
Siringaldeído (SI)	0,272	$\pm 0,124$	2,188	0,093**
AA x AF	-0,007	$\pm 0,124$	-0,060	0,954
AA x SI	0,117	$\pm 0,124$	0,943	0,398
AF x SI	-0,152	$\pm 0,124$	-1,224	0,287

\*\*Significativo ao nível de 90% de confiança;;  $R^2 = 0,77$ .



**Figura 5.8.** Variação do fator de conversão de xilose em xilitol (A) e da produtividade volumétrica em xilitol (B) com os níveis das variáveis: ácido acético (AA) e siringaldeído (SI), durante a fermentação de *C. guillermondii* em meio definido não tamponado.

### 5.3. Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando o Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz

O objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade do ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI) sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, em meios preparados com o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Como mencionado anteriormente, estes compostos foram selecionados como representativos dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, obtido por hidrólise ácida, com base em estudo anterior (Cortez, 2005). Para avaliar o efeito tóxico destes compostos no hidrolisado, utilizou-se o hidrolisado de palha de arroz obtido por Silva (2007), previamente destoxificado com carvão ativado. Após a caracterização quanto aos compostos em estudo, o hidrolisado foi suplementado com AA, AF e SI de forma a se obter concentrações similares as máximas testadas em meio definido, ou seja, 2,6 g/L de AA; 0,6 g/L de AF e 0,8 g/L de SI.

Uma vez que a produção de xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, não requer a suplementação nutricional (Mussatto e Roberto, 2005), o hidrolisado concentrado (116 g/L de xilose) foi apenas diluído com água até se obter uma concentração de xilose de 80 g/L. Foi objetivo também avaliar a fermentabilidade do hidrolisado com ou sem adição de sais de fosfato para o tamponamento do meio. Entretanto, com a adição de fosfato de potássio (0,2 M), observou-se uma formação intensa de precipitados, o que prejudicou a amostragem dos ensaios e por esta razão os resultados obtidos não foram considerados. Desta forma, o efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído nas concentrações de 2,6, 0,6 e 0,8 g/L, respectivamente, foi avaliado em hidrolisado não tamponado e sem suplementação nutricional. Os efeitos destes compostos sobre o crescimento e a produção de xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado e em meio definido estão apresentados nas Tabelas 5.11 a 5.14.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.11, nota-se que o hidrolisado tratado com carvão ativado ainda apresentou concentrações residuais de compostos inibidores (1,4 de ácido acético, 0,1 g/L de ácido ferúlico e 0,1 de siringaldeído). Avaliando os resultados da fermentação neste

hidrolisado, observa-se que o consumo de xilose foi parcial, apresentando uma concentração residual de 12 g/L, após 96 h de processo, com uma produção de 47,1 g/L de xilitol. Nota-se que a produção de xilitol foi inferior a obtida em meio definido ausente de inibidores (55,6 g/L), após o mesmo tempo de fermentação. Entretanto, o consumo de xilose no meio definido foi praticamente total, o que indica um efeito negativo dos inibidores presentes no hidrolisado sobre as velocidades do bioprocessos. Em hidrolisado suplementado com AA, AF e SI (Tabela 5.12), a produção de xilitol foi ainda menor atingindo uma concentração de 31,8 g/L, o que correspondeu a uma redução de 32%, quando comparado ao hidrolisado não suplementado. Comportamento semelhante foi também observado no meio definido que apresentou redução de 38% nos valores de concentração de xilitol após 96 h, quando o meio foi suplementado com os compostos inibidores (Tabelas 5.13 e 5.14). Estes resultados confirmam que os compostos selecionados são representativos da inibição da bioconversão de xilose em xilitol, por *C. guilliermondii* a partir do hidrolisado de palha de arroz e que a destoxificação é necessária para melhorar a fermentabilidade do hidrolisado.

**Tabela 5.11.** Resultados da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado, sem adição de ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	3,2	11,5	77,3	nd	1,4	0,1	0,1	nd
72	5,4	9,3	nd	25,3	43,2	3,4	0,1	0,1	7,6
96	5,5	9,8	nd	12,0	47,1	3,7	0,2	0,1	8,6

**Tabela 5.12.** Resultados da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz suplementado com de ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	3,2	12,2	79,9	nd	2,2	0,6	0,75	nd
72	5,2	6,6	nd	23,3	30,0	3,6	0,6	0,8	10,0
96	5,0	7,1	nd	17,3	31,8	3,6	0,6	0,8	10,2

nd = não detectado.

**Tabela 5.13.** Resultados da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em meio definido sem adição de ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	3,2	13,5	81,7	nd	nd	nd	nd	nd
72	2,7	6,4	nd	20,7	44,4	nd	nd	nd	nd
96	2,3	7,6	nd	0,3	55,6	nd	nd	nd	6,2

nd = não detectado

**Tabela 5.14.** Resultados da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em meio definido suplementado com de ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,6	3,2	12,2	78,9	nd	2,7	0,7	0,8	nd
72	4,8	6,6	nd	27,0	33,0	3,2	0,6	0,8	nd
96	4,8	5,9	nd	13,8	34,2	3,8	0,6	0,8	9,5

nd = não detectado

Os parâmetros fermentativos de *C. guilliermondii* obtidos durante o cultivo da levedura nos diferentes meios avaliados (hidrolisado e meio definido) estão sumarizados na Tabela 5.23. Para efeito comparativo, foram

apresentados nesta tabela os resultados obtidos por Cortez (2005), que avaliou a bioconversão de xilose em xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificado. Observa-se que a bioconversão foi afetada pela presença dos inibidores nos meios. Observa-se que o maior fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S} = 0,72$  g/g), foi obtido em meio hidrolisado não suplementado, porém a máxima produtividade volumétrica foi obtida em meio definido na ausência de inibidores. Quando comparado aos resultados obtidos por Cortez (2005), verifica-se que o maior efeito dos inibidores foi sobre a produtividade volumétrica ( $Q_P = 0,18$  g/L.h) devido a baixa eficiência de assimilação de xilose (43%), o que sugere que os compostos inibitórios afetam o transporte de nutrientes pela célula.

**Tabela 5.15.** Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e meio definido, com e sem suplementação dos inibidores: ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído.

Parâmetros fermentativos após 96 h							
Meios		$C_{XI}$ (%)	$P_{XO}$ (g/L)	$X_f$ (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/L.h)
<b>HDC</b>	*Suplementado com inibidores	78	31,8	7,1	0,51	0,05	0,33
	**Não suplementado com inibidores	84	47,1	9,8	0,72	0,08	0,49
<b>MD</b>	*Suplementado com inibidores	82	34,2	5,9	0,52	0,03	0,36
	Não suplementado com inibidores	99	55,6	7,6	0,68	0,05	0,58
<b>HNDC</b>	Não destoxificado	43	17,3	4,1	0,47	0,04	0,18

HDC = meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado e concentrado (ajustado para 80 g/L de xilose); HNDC = meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificado (80 g/L de xilose) de acordo com Cortez, 2005; MD = meio definido formulado com xilose comercial (80 g/L de xilose)

\* ácido acético = 2,3 g/L; ácido ferúlico = 0,6 g/L e siringaldeído = 0,8 g/L ; \*\* Concentração residual no hidrolisado: ácido acético = 1,4 g/L; ácido ferúlico = 0,1 g/L e siringaldeído = 0,1 g/L

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- A bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em meio definido tamponado é influenciada pela presença de ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído, sendo o grau de inibição dependente da concentração do composto no meio;
- Para os três compostos avaliados, a inibição sobre o crescimento celular foi muito mais acentuada do que sobre os parâmetros fermentativos da biossíntese de xilitol.
- O siringaldeído, nas concentrações estudadas, não afetou (<10%) a produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii*.
- Para todas as combinações dos compostos avaliadas, no planejamento experimental, o tamponamento do meio de fermentação favoreceu a formação de biomassa, a produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ).
- Nas concentrações avaliadas, os compostos não apresentaram efeito de interação, ou seja os efeitos são aditivos;
- Em meios tamponados, o siringaldeído não apresentou efeito significativo sobre os parâmetros fermentativos avaliados. Nestes meios, o ácido acético e o ácido ferúlico apresentaram efeito negativo sobre a produtividade volumétrica em xilitol, sendo mais pronunciado pelo ácido acético do que pelo ácido ferúlico;
- Em meios não tamponados, o ácido ferúlico não apresentou efeito significativo sobre os parâmetros fermentativos avaliados. Nestes meios, o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), foram influenciadas negativamente pelo ácido acético e positivamente pelo siringaldeído, ou seja o efeito negativo do ácido acético foi anulado pela presença de siringaldeído no meio de fermentação;
- Em hidrolisado de palha de arroz, o perfil de inibição dos compostos avaliados foi similar ao do meio definido não tamponado, o que confirma a necessidade de destoxificação para remoção dos inibidores.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.L.; OETTERER, M.; MENEZES, T.J.B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* (Bol.SBCTA), v. 33, n. 2, p. 184-193, 1999.
- AHMED, Z. Production of natural and rare pentoses using microorganisms and their enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 103-111, jul., 2001.
- ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.; SILVA, S.S., PRATA, A.M.R. Pre Treatment of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 70-72, p. 89-98, 1998.
- ANASTASSIADIS, S.; REHM, H.J.; Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continous and repeated bach cultivation, *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, n.1, jan., 2006
- ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Fermentation Tecnology*, v. 6, n. 6, p. 567-570, 1986.
- ARBEX, M. A. Avaliação dos efeitos de material particulado provenientes de queimadas de plantação de cana-de-açúcar sobre a morbidade da respiratória na população de Araraquara. 2001. 188 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2001.
- BAR, A. Xylitol. In: O'BREIN NABORS, L.; GELARDI, R. *Alternatives sweeteners*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 349-379.
- BARBOSA, M.F.S.; MEDEIROS, M.B.; MANCILHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors wich affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, v.3, p. 241-251, 1988.
- BARTHELMEBS, L.; DIVIÈS, C.; CAVIN, J. F. Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*, *LAIT:Physiology, metabolism*, v. 81, p. 161-171, 2001.
- BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, p. 90-104, 1981.

- BORNEMAN, W. S.; AKIN, D. E.; VanESELTIME. Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, n. 6, p. 1331-1339, dec., 1986.
- CANNETTIERI, E.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Application of Factorial Design to the Study of Xylitol Production from Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.94, p.159-168, 2001.
- CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J.M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* e *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 82, p. 141-151, 1999.
- CORTEZ, D. V. Influência dos produtos de degradação de lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* 2005. 100 f. Dissertação (Mestrado) – FAENQUIL, Lorena, 2005.
- DELGENES, J.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 220-225, 1996.
- DOMINGUEZ, J.M.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Production of Xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.63-65, p.117-127, 1997.
- DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GIRIO, F. M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, n. 124, p. 413-426, 2005.
- EDGAR, W. M. Sugar Substitutes, Chewing-Gum and Dental Caries – a Review. *British Dental Journal*, v. 184, p. 29-32, 1998.
- EL-MASRY, H.G. Utilisation of egyptian rice straw in production of cellulases and microbial protein: effect of various pretreatments on yields of protein and enzyme activity. *Journal of the Science and Food Agriculture*, v.34, p.725-732, 1983.
- ERLANDSON, K.A.; PARK, J.H.; KHAL W. E.;KAO, H. H.; BASARAN, P.; BRYDGES, S.;BATT, C.A. Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 3974-3980, Set., 2000.

- FADILU, S.; ERKMEN, O. Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Turkish Journal Engineering Environmental Science*, v. 26, p. 249-254. Jan., 2002
- FELIPE, M.G. A.; RODRIGUES, R.C.L.B.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I. Toxicity of Acetic Acid During the Production of Xylitol by Batch Fermentation Using Lignocellulosic Hydrolysate at Low pH. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS 21., may 2-6-1999. University Park Holiday Inn Fort Collins, Colorado. *Program and Abstracts*.
- FELIPE, M.G.A., VITOLO, M., MANCILHA, I. M., SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. *Biomass and Bioenergy*, v. 13, n. 1/2, p. 11-14, 1997b
- FELIPE, M.G.A., VITOLO, M., MANCILHA, I.M., SILVA, S.S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 251-254, 1997a
- FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; ROSA, S.A.M. Preparation of Xylitol by Fermentation of a Hydrolysate of Hemicellulose Obtained from Sugarcane Bagasse. *Archive of Biology and Technology*, v.36, n.1, p.103-114, 1993.
- FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 35, p. 171-177, 1995.
- FENSKE, J. J.; GRIFFIN, D. A.; PENNER, M. H. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 20., p. 364-368, 1998.
- FURLAN, S.; CASTRO, H. F. Xylitol production by *Candida parapsilosis* under fed-batch culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 44, n. 2, p. 125-128, Jun. 2001.
- GIMENES, M. A. P., CARLOS, L. C. S., PEREIRA Jr, N. Influência da idade do inóculo na bioprodução de xilitol por *Candida guilliermondii* IM/URFJ 50088. In: Sinaferm, 13., Ago. 2000, Teresópolis, Rio de Janeiro. *Anais*.
- GONÇALVES, N. C. L. A. V.; JUNIOR, A. V.; SALVADOR, S. L. S. Efeito de soluções fluoretadas contendo xilitol e sorbitol no número de estreptococos do grupo mutans na saliva de seres humanos. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, v. 9, n 1, p. 30-34, 2001.

- GRANSTRÖM, T. Biotechnological production of xylitol with *Candida* yeasts. 2002. 72 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Espoo (Finlândia), 2002.
- GULDFELDT, L.U.; ARNEBORG, N. Measurement of effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 530-534, Feb., 1998.
- HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xilose fermentation by yeast. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 16, p. 933-943, Nov., 1994.
- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, 2005.
- HEIKKILÄ, H., NURMI, J., RAKKILA, L., TÖYRYLA, M., KIKKONUMMI. *Method for the Production of Xylitol*. US Patent. 5.081.026. 1992.
- HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 786-792, 2003.
- HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, Z.M.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A.J.P.; COOTE, P.J. Activity of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 9, p. 3158-3164, Sept., 1996.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em, 28 de maio de 2007.
- JACKSON, S.; NICOLSON, S. W. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, v. 131, p. 613-620, 2002.
- JACOBS, J., KREUTZER, R., SMITH, D. Rice burning and asthma hospitalizations, Butte County, California, 1983-1992. *Environmental Health Perspectives*, v. 105, p. 980-985, 1997.

- JIN, Y.S.; LAPLASA, J. M.; JEFFRIES, T. W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 11, Nov., 2004.
- KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass Bioenerg*, v. 18, p. 369-389, 2000.
- KLINKE, H. B.; AHRING, B. K.; SCHMIDT, A. S.; THOMSEN, A. B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 15-26, 2002.
- KLINKE, H.B.; OLSSON, L.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 6, p. 738-747, 2003.
- KUHAD, R.C., SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.
- LARSSON, S.; SÁINZ-QUINTANA, A.; REIMANN, A.; NIVEBRANT, N. O.; JÖNSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, n. 86, 2000.
- LATIF, F.; RAJOKA, M.I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 57-63, 2001.
- LEE, W.G., LEE, J.S., SHIN, C.S., PARK, S.C., CHANG, H.N., CHANG, Y.K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 547-559, 1999.
- LIMA, L. H. A.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; TORRES, F. A. G. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 65, p. 734-738, Abril, 2004.
- LIN, S.Y.; DENCE, C.W. *Methods in lignin chemistry*, Germany: Springer-Verlag, p. 3-19, 1992.
- LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of poplar hydrolyzate to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 22, p. 125-138, 2002.

- MAGUIRE, A; RUGG-GUNN, A. J. Xylitol and caries prevention – is it a magic bullet?, *British Dental Journal*, v. 194, n. 8, p. 429-436, April, 2003.
- MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.
- MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explains the clinical observations made with xilitol?, *Medical Hypotheses*, v. 54, n. 4, p. 603-613, 2000 b
- MÄKINEN, K. K. The rocky road of xylitol to its clinical application. *J. Dent. Res.*, v. 79, n. 6, p. 1352-1355, 2000 a.
- MÄKINEN, K. K. Xylitol and oral health. *Advances in Food Research*, v. 25, p. 137-158, 1979.
- MÄKINEN, K. K.; OLAK, J.; RUSSAK, S.; SAAG, M. SEEDRE, T.; VASAR, R.; VIHALEM, T., MILKELSSAR, M., MÄKINEN, P. Polyol-combinant saliva stimulants: a 4-month pilot study in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 56, p. 90-94, 1998.
- MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol – it's properties and use as a sugar substitute in food. In: *Food R. A. Symp. Sugar and Sugar Replacements*, 10 oct., 1973.
- MARTIN, C.; GALBE, M.; NIVERBRAND, N. O.; JÖNSSON, L. J. Comparison of the fermentabilidade of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 699-715, 2002.
- MAYERHOFF, Z.D.V.L., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S., FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M. Seleção de leveduras para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. In: Sinaferm, 11. Ago 1996. *Anais*.
- MELAJA, A. J.; HAMÄLÄINEN, L. *Process for making xilitol*. U.S. Patent 4.008.285. 18 Jun. 1975. Publ. 15 Feb 1977.
- MORITA, T.A.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 751-759, 2000.

- MUSSATTO, S.I.; SILVA, C.J.S.; ROBERTO, I.C. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 72, p. 681-689, 2006.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1681-1684, 2001.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Produção biotecnológica de xilitol a partir de palha de arroz, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 28, p. 34-39, out., 2002.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 331-337, 2003.
- MUSSATTO, S.I. Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. na produção de xilitol por *Candida guilliermondii* 2002. 173 f. Dissertação (Mestrado) – FAENQUIL, Lorena, 2002.
- NATAH, S. S.; HUSSIEN, K. R.; TUOMINEN, J. A.; KOIVISTO, V. A. Metabolic response to lactitol and xilitol in healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 65, n. 4, p. 947-950, 1997.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 312-331, 1996.
- ONISHI, H.; SUZUKI, T. Production of D-mannitol and glycerol by yeast. *Applied Microbiology*, v. 16, n. 12, p. 1847-1952, dec., 1968.
- OOI, B. G.; LE, T.T.B., MARKUSZEWSKI, B. M. The effects of glucose on the yeast conversion of xylose into xylitol by *C. Guilliermondii* and *C. Tropicalis*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry*, v. 1, n. 3, p. 189 – 202, 2002.
- PALMQVIST, E.; GRACE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hidroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, n. 1, p. 46-55. 1999.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24, 2000 b.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 25-33, 2000 a.
- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 191-201, 1998 b.
- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 203-212, 1998 c.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol, Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Biorresource Technology*, v. 66, p. 25-40, 1998 a.
- PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. In: FIECHTER, A. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 38, p. 53-87, 1989.
- PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F. Production of sophorolipids using the yeast *Candida bombicola* ATCC 22214 for the applications in the food industry. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, v. 2, Abr., 2006.
- PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology*, Chicago. v. 42, n. 10, 1988.
- PEREGO, P.; CONVERTI, A.; PALAZZI, E.; DEL BORGHI, M.; FERRAILOLO, G., Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysisate by *Pachysolen tannophilus*, *C. shehate* and *Pichia stiptis*. *Journal Industrial Microbiology*, v. 6, p. 157-164, 1990.
- PETTERSEN, R. C. The chemical composition of wood. In: Rowell, Roger M., ed. 1. *The chemistry of solid wood. Advances in chemistry series 207*. Washington, DC: American Chemical Society, 1984.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixture to xylitol by *Candida parapsilosis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 124-129, 1997.
- RANATUNGA, T.D.; JERVIS, J.; HELM, R.F.; Mc MILLAN, J.D.; HATZIS, C. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) xylose fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 67, p. 185-198, Jan., 1997.

Resolução CONSEMA N° 002/00. Disponível em <<http://www.sema.rs.gov.br>>  
Acesso em, 25 de janeiro de 2006.

ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.C.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Candida guilliermondii* for Xylitol Production. *Biores. Tech.*, v.36, p.271-275, 1991

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Influence of  $K_La$  on Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate to xylitol. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v.21, p.505-508, 1999.

ROBERTO, I.C.; MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, R.C.L.B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products*, v. 17, p. 171-176, 2003.

ROBERTO, I.C.; SATO, S.; MANCILHA, I.M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 16, p. 348-350, 1996.

ROBERTO, I.C.; SATO, S.; MANCILHA, I.M.; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnology Letters*, v. 17, n. 11, p. 1223-1228, 1995.

ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol: Effect of pH and nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 339-347, 1996.

RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A., ROBERTO, I.C., VITOLLO, M. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate at controlled pH values. *Bioprocess Biosystem. Eng.*, v. 26, p. 103-107, 2003.

ROSEIRO, J.C., PEITO, M.A., GIRIO, F.M., AMARAL-COLLAÇO, M.T. The Effects of the Oxygen Transfer Coefficient and Substrate Concentration on the Xylose Fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Arch of Microbiol*, v.156, p.484-490, 1991.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 279-291, Abr., 2003.

- SAMPAIO, F. C.; SILVEIRA, W. B.; CHAVRES-ALVES, V. M.; PASSOS, F. M. L.; COELHO, J. L. C. Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 325-328, Sept., 2003.
- SCHEININ A.; MÄKINEN, K. K. TAMMISALO, E.; REKOLA, M. Turku sugar studies XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of xilitol chewing gum. *Acta Odontol Scand*, v. 33, p. 269-278, 1975.
- SCULLY, C.; FELIX, D. H. Oral medicine – Update for the dental practitioner. Dry mouth and disorders of salivation. *British Dental Journal*, v. 199, n. 7, p. 423-427, Oct, 2005.
- SILVA, C. J. S. M. Planejamento e otimização de parâmetros no processo fermentativo de obtenção de xilitol empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz 1999. 116 f. Dissertação (Mestrado) – FAENQUIL, Lorena, 1999.
- SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, p. 248-252, Jan. 2001.
- SILVA, C.J.S.M., ROBERTO, I.C. Statistical Screening Method for Selection of Important Variables on Xylitol Biosynthesis from Rice Straw Hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Biotech. Tech.*, v.13, p.743-747, 1999.
- SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCHILHA, I. M.; LUCHESE, R. H.; SILVA, S. S. Inhibitory effect of acetic acid on biconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugar bagasse hydrolysate. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p. 248-254, Aug, 2004.
- SILVA, J. P. A. Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado) – FAENQUIL, Lorena, 2007.
- SILVA, S. S.; VITOLO, M.; PESSOA JR, A.; FELIPE, M. G. A. Xylose reductase and xilitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 36, p. 187-191, 1996.
- SILVA, S.S., MANCILHA, I.M., QUEIROZ, M.A., FELIPE, M.G.A., ROBERTO, I.C., VITOLO, M. Xylitol Formation by *Candida guilliermondii* in Media Containing Different Nitrogen Sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, Aug, 1994.

- SÖDERLING, E.; ISOKANGA, P.; PIENIHÄKKINEN, K.; TENOVUO, J. Influence of maternal xilitol consumption on acquisition of Streptococci mutans by infants. *Journal of Dental Research*, v. 79, n. 3, p. 882-887, 2000.
- SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydrate Polymers*, v.42, p.111-122, 2000.
- TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; IKÄHEIMO, I.; UHARI, M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xilitol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 225-228, Jan, 2004.
- TRAHAN, L.; NÉRON, S.; BAREIL, M. Preparation and purification of xilitol-5-phosphate from a cell extract of *Lactobacillus casei* CI-16. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 570-73, Feb. 1988.
- TRAN, A. V.; CHAMBERS, P. R. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xilose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Biotechnology Letters*, Middlesex, v. 7, n. 11, p. 841-846, 1985.
- UHARI, M. KONTIOKARI, T.; NIEMELÄ, M. A novel use of xilitol sugar in preventing otitis media. *Pediatrics*, v. 102, n. 4, p. 879-884, Oct, 1998.
- ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, apr., 2002.
- VARGAS, K. G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 2, p. 341-350, feb., 2002.
- VOGEL, H. C.; TADARO, C. L. Fermentation and biochemical engineering handbook. In: *Principles, process design, and equipment*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Noyes Publications, 1997.
- WATSON, N. E.; PRIOR, B. A.; LATEGAN, P. M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microbial Technology*, v. 6, p. 451-459, 1984.
- WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

ZABNER, J., SEILER, M.P., LAUNSPACH, J.L., KARP, P.H., KEARNEY, W.R., LOOK, D.C., SMITH, J.J., WELSH, M.J. The Osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 21, p. 11614 - 11619, 2000.

ZALDIVAR, J., INGRAM, L.O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY 01. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 66, n. 4, p. 203-210, Jully, 1999.

ZALDIVAR, J., MARTINEZ, A., INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, n. 5, p. 524-530, June, 2000

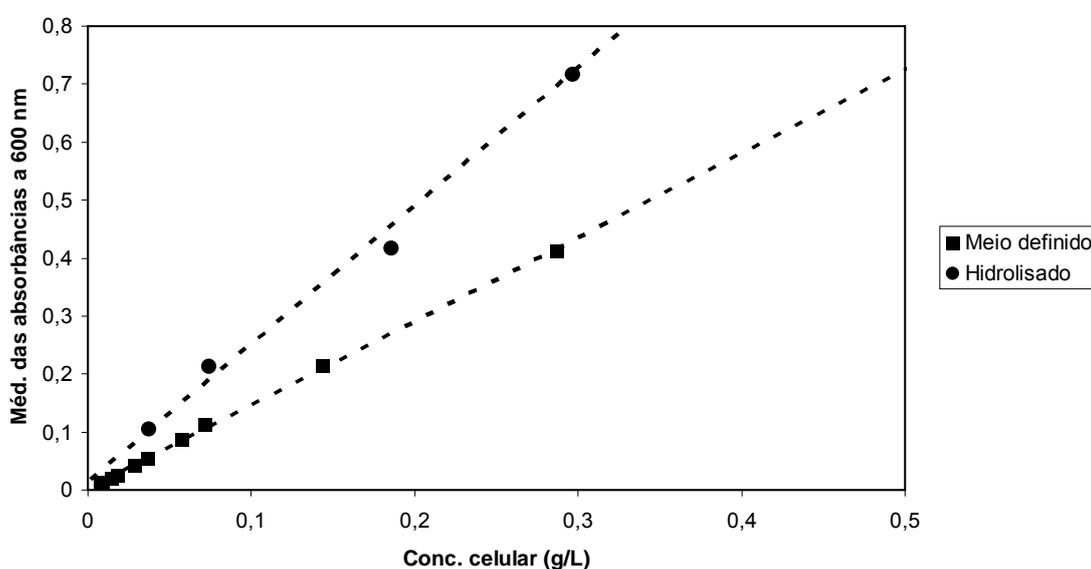
ZALDIVAR, J., MARTINEZ, A., INGRAM, L.O. Effect of selected aldehydes on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 65, n. 1, p. 24-33, Mach, 1999.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A. Curvas de Calibração

#### Curva de Calibração de Biomassa

Encontram-se a seguir as curvas obtidas para a calibração da concentração celular, pelo método de peso-seco em função da absorbância, a 600 nm. Foram realizadas calibrações no meio definido e a base de hidrolisado, com células lavadas com água destilada.



**Figura A.1.** Curvas de calibração de biomassa (em g/L), para meios à base de hidrolisado e meios definidos.

Curva de calibração do hidrolisado:

$$D.O. = 0,0131 + 2,3829 \times \text{Biomassa} \quad (R^2 \ 0,9951)$$

Curva de calibração do meio definido:

$$D.O. = 0,0025 + 1,4451 \times \text{Biomassa} \quad (R^2 \ 0,9993)$$

## Curva de Calibração de Açúcares, Ácido Acético e Etanol

Apresenta-se a seguir as curvas obtidas para a calibração das concentrações de açúcares glicose, xilose, xilitol, ácido acético e etanol. Na Tabela A.1 são mostrados os açúcares, ácido orgânicos e álcoois, seus tempos de eluição, as equações que relacionam a concentração (C) com áreas obtidas nos cromatogramas e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para cada equação.

**Tabela A.1.** Curva de calibração de açúcares, ácido acético e etanol.

Componente	Tempo (min.)	Equações	Correlação
Glicose	8,50	$C \text{ (g/L)} = -0,00697 + 8,98E-0,7^* \text{ Área}$	$R^2 = 0,99999$
Xilose	9,18	$C \text{ (g/L)} = -0,00446 + 8,78E-07^* \text{ Área}$	$R^2 = 0,99997$
Xilitol	11,05	$C \text{ (g/L)} = 0,00619 + 9,05E-07^* \text{ Área}$	$R^2 = 0,99995$
Ác. Acético	14,33	$C \text{ (g/L)} = 0,01880 + 1,89E-06^* \text{ Área}$	$R^2 = 0,99988$
Etanol	19,82	$C \text{ (g/L)} = 0,01902 + 2,16E-06^* \text{ Área}$	$R^2 = 0,99988$

### Condições de operação:

- Coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300X7,8mm);
- Temperatura 45°C;
- Eluente: ácido sulfúrico 0,01N desgaseificado;
- Fluxo: 0,6 mL/min;
- Volume de amostra: 20  $\mu$ L;
- Detector: índice de refração.

### Curvas de calibração de siringaldeído e ácido ferúlico

Apresenta-se a seguir as curvas obtidas para a calibração das concentrações dos compostos fenólicos. Na Tabela A.2 são mostrados os compostos fenólicos e equações que relacionam a concentração (C) com áreas obtidas nos cromatogramas e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para cada equação.

**Tabela A.2.** Curva de calibração de ácido ferúlico e siringaldeído

Compostos fenólicos	Equações	Correlação
Siringaldeído	$C \text{ (g/L)} = 2,08E03 - 3,11E-08 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99993$
Ácido Ferúlico	$C \text{ (g/L)} = 4,68E03 - 1,94E-08 * \text{Área}$	$R^2 = 0,999937$

### Condições de operação:

- Coluna Waters Resolve  $C_{18}$  5  $\mu\text{m}$  (3,9 X 300mm);
- Temperatura: Ambiente;
- Eluente: 1/8 Aceto nitrina/água, 1% Ácido acético e 0,16% Ácido fosfórico, desgaseificado;
- Fluxo: 0,8 mL/min;
- Volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$ ;
- Detector: UV a 276 nm.

## APÊNDICE B. Resultado do Efeito do Ácido Acético; Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre o Crescimento e a Produção de Xilitol por *C. guilliermondii* em Meio Definido

Nas tabelas abaixo estão representados os resultados da fermentação de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em meios definidos suplementados com ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI). A concentração celular foi definido pelo método de peso seco, enquanto que a concentração de açúcares foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – WATERS), Foi também determinada o valor de pH por potenciometria.

**Tabela B.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio definido sem a suplementação do ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI) (controle).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,6	2,4	14,5	78,6	nd	nd	nd	nd	nd
24	5,4	8,8	nd	52,8	22,1	nd	nd	nd	6,78
48	5,1	10,2	nd	24,6	45,5	nd	nd	nd	6,98
72	5,1	11,9	nd	1,4	64,7	nd	nd	nd	6,54
96	5,2	13,6	nd	nd	57,4	nd	nd	nd	7,19

nd = não detectado

**Tabela B.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,8 g/L de ácido acético.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	2,5	14,8	79,9	Nd	0,8	nd	nd	nd
24	5,4	8,5	nd	55,9	21,4	nd	nd	nd	6,8
48	5,3	9,5	nd	24,9	40,4	nd	nd	nd	7,0
72	5,3	11,9	nd	nd	66,2	nd	nd	nd	6,8
96	5,0	13,2	nd	nd	71,3	nd	nd	nd	7,2

nd = não detectado

**Tabela B.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,1 g/L de ácido acético.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	3,2	12,5	81,0	Nd	1,1	nd	nd	nd
24	5,7	6,4	nd	62,8	16,7	3,7	nd	nd	8,9
48	5,9	8,7	nd	28,8	46,1	3,0	nd	nd	5,8
72	5,9	10,9	nd	1,48	66,8	3,6	nd	nd	6,0
96	5,6	12,7	nd	nd	70,6	3,7	nd	nd	7,5

nd = não detectado

**Tabela B.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 g/L de ácido acético.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	3,1	11,2	80,0	nd	2,6	nd	nd	nd
24	5,4	6,2	nd	62,3	15,7	3,8	nd	nd	6,6
48	5,1	6,9	nd	34,8	37,5	3,6	nd	nd	6,5
72	5,2	8,4	nd	11,2	52,8	4,1	nd	nd	8,0
96	5,2	9,5	nd	nd	58,4	4,2	nd	nd	7,5

nd = não detectado

**Tabela B.5.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido controle.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	2,3	14,2	75,8	nd	nd	nd	nd	nd
24	5,6	11,6	nd	50,4	22,6	nd	nd	nd	3,7
48	5,6	12,5	nd	21,5	44,9	nd	nd	nd	2,6
72	5,8	14,7	nd	nd	59,9	nd	nd	nd	4,6
96	5,3	13,5	nd	nd	58,4	nd	nd	nd	4,9

nd = não detectado

**Tabela B.6.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,3g/L de siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	2,3	13,9	77,9	nd	nd	nd	0,3	nd
24	5,6	6,8	nd	53,4	21,4	nd	nd	0,3	2,8
48	5,4	10,1	nd	24,7	41,6	nd	nd	0,2	2,6
72	5,2	12,0	nd	1,35	61,7	nd	nd	0,2	4,6
96	5,2	11,9	nd	nd	59,2	nd	nd	0,0	4,3

nd = não detectado

**Tabela B.7** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,5 g/L de siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	2,5	14,3	80,0	nd	nd	nd	0,5	nd
24	5,4	6,3	nd	55,5	20,6	nd	nd	0,4	3,1
48	5,5	7,7	nd	25,8	40,5	nd	nd	0,3	7,6
72	5,3	8,0	nd	1,6	58,9	nd	nd	0,1	6,8
96	5,3	11,8	nd	nd	63,5	nd	nd	0,0	5,7

nd = não detectado

**Tabela B.8.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,8g/L de siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,6	2,3	14,2	71,4	nd	nd	nd	0,8	nd
24	5,7	5,4	nd	61,6	19,4	nd	nd	0,7	2,4
48	5,6	7,2	nd	25,9	40,4	nd	nd	0,5	6,4
72	5,3	7,5	nd	1,7	58,9	nd	nd	0,3	6,2
96	5,3	10,3	nd	nd	60,6	nd	nd	0,1	6,4

nd = não detectado

**Tabela B.9.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido para controle.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	3,7	13,6	79,8	nd	nd	nd	nd	nd
24	5,5	7,6	nd	45,5	28,8	nd	nd	nd	7,7
48	5,5	10,2	nd	13,7	53,6	nd	nd	nd	7,0
72	5,3	11,5	nd	nd	59,9	nd	nd	nd	7,3
96	5,4	12,5	nd	nd	58,6	nd	nd	nd	6,0

nd = não detectado

**Tabela B.10.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,2 g/L de ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,6	4,2	13,8	78,9	Nd	nd	0,2	nd	nd
24	5,3	7,9	nd	44,4	29,3	nd	0,2	nd	8,0
48	5,2	10,9	nd	12,0	52,8	nd	0,2	nd	7,5
72	5,2	10,7	nd	nd	54,2	nd	0,2	nd	6,4
96	5,2	11,4	nd	nd	55,0	nd	0,2	nd	6,7

nd = não detectado

**Tabela B.11.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,4 g/L de ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	3,9	12,2	71,2	nd	nd	0,4	nd	nd
24	5,0	7,5	nd	45,0	25,8	nd	0,4	nd	7,3
48	5,2	8,9	nd	19,4	48,5	nd	0,4	nd	3,2
72	5,3	10,2	nd	2,3	50,7	nd	0,4	nd	2,6
96	5,2	10,2	nd	nd	55,6	nd	0,4	nd	8,0

nd = não detectado

**Tabela B.12.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,6 g/L de ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	4,3	10,9	80,2	nd	nd	0,6	nd	nd
24	5,4	6,8	nd	50,3	26,1	nd	0,6	nd	8,8
48	5,2	8,6	nd	22,4	43,0	nd	0,6	nd	2,6
72	5,1	9,0	nd	5,2	51,3	nd	0,6	nd	9,8
96	5,2	9,0	nd	0,5	51,6	nd	0,6	nd	9,6

nd = não detectado

**APÊNDICE C. Resultado da Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando a Metodologia do Planejamento Experimental Com Tamponamento.**

Nesta seção encontram-se representados por tabelas, os valores do para todos os ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ , com 3 pontos centrais tamponados, em meios definidos suplementados com ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI). A concentração celular foi definido pelo método de peso seco, enquanto que a concentração de açúcares foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – WATERS), Foi também determinada o valor de pH por potenciometria.

**Tabela C.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido para controle.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	2,4	15,0	93,7	nd	nd	nd	nd	nd
72	5,7	11,1	nd	5	70,2	nd	nd	nd	5,2
96	5,6	13,5	nd	nd	73,2	nd	nd	nd	8,7

nd = não detectado

**Tabela C.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 g/L ácido acético.

Tempo (h)	PH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	3,1	11,2	80	nd	2,6	nd	nd	nd
72	5,2	8,4	nd	11,2	52,9	4,1	nd	nd	8
96	5,2	9,5	nd	nd	58,4	4,2	nd	nd	7,5

nd = não detectado

**Tabela C.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,6 g/L ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	2,7	14,0	96,3	nd	nd	0,6	nd	nd
72	5,2	8,9	nd	12,8	60,3	nd	0,6	nd	4,3
96	5,7	9,2	nd	nd	63,85	nd	0,6	nd	7,6

nd = não detectado

**Tabela C.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 de ácido acético e 0,6 g/L ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,3	3,2	10,82	88,2	nd	2,6	0,6	nd	nd
72	5,2	7,5	nd	31,7	43,5	4,5	0,6	nd	4,9
96	5,2	7,5	nd	14,7	50,0	4,5	0,6	nd	5,0

nd = não detectado

**Tabela C.5.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	2,6	14,4	91,1	nd	nd	nd	0,8	nd
72	5,5	8,9	nd	12,49	65,53	nd	nd	0,8	0,65
96	5,2	9,5	nd	4,9	73,03	nd	nd	0,8	5,55

nd = não detectado

**Tabela C.6.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 g/L de ácido acético e 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5	2,6	15,6	92,7	nd	2,6	nd	0,8	nd
72	5,5	4,9	nd	19,7	52,4	1,1	nd	0,8	7,68
96	5,8	6,6	nd	4,9	66,1	nd	nd	0,8	7,54

nd = não detectado

**Tabela C.7.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,6 g/L de ácido ferúlico e 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	2,3	14,9	92,2	nd	nd	0,6	0,8	nd
72	5,2	7,8	nd	19,1	62,5	nd	0,6	0,8	4,6
96	5,1	9,2	nd	3,4	69,5	nd	0,6	0,8	4,6

nd = não detectado

**Tabela C.8.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 g/L de ácido acético; 0,6 g/L de ácido ferúlico e 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,3	3,1	12,2	85,9	nd	2,7	0,6	0,8	nd
72	5,3	7,4	nd	34,7	44,3	3,5	0,6	0,8	5,0
96	5,2	7,4	nd	15,3	61,0	2,9	0,6	0,8	5,0

nd = não detectado

**Tabela C.9.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,7 g/L de ácido acético; 0,3 g/L de ácido ferúlico e 0,4 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	2,6	14,9	93,5	Nd	1,7	0,3	0,4	nd
72	5,0	6,2	nd	17,9	56,5	1,4	0,3	0,4	8,2
96	5,0	7,5	nd	2,2	57,5	1,0	0,3	0,4	7,8

nd = não detectado

**Tabela C.10.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,7 g/L de ácido acético; 0,3 g/L de ácido ferúlico e 0,4 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	2,7	15,9	94,2	Nd	1,8	0,3	0,4	nd
72	5,2	6,4	nd	19,2	59,3	1,5	0,3	0,3	8,2
96	5,0	7,8	nd	2,6	62,9	1,0	0,3	0,4	8,3

nd = não detectado

**Tabela C.11.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,8 g/L de ácido acético; 0,3 g/L de ácido ferúlico e 0,4 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	3,1	14,6	92,3	nd	1,8	0,3	0,4	nd
72	5,3	6,8	nd	17,2	50,8	1,5	0,3	0,4	8,6
96	5,0	8,0	nd	2,9	62,2	1,1	0,3	0,4	9,1

nd = não detectado

**APÊNDICE D. Resultado da Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando a Metodologia do Planejamento Experimental Sem Tamponamento.**

As tabelas a seguir apresentam valores do cultivo de *C. guilliermondii* em meio definido, suplementado com ácido acético (AA), ácido ferúlico (AF) e siringaldeído (SI) de acordo com um planejamento fatorial  $2^3$ , com 3 pontos centrais sem tamponamento e com a correção do pH inicial 5,5 com NaOH 0,1 N. A concentração celular foi definida pelo método de peso seco, enquanto que a concentração de açúcares foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – WATERS), Foi também determinada o valor de pH por potenciometria.

**Tabela D.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio definido para controle.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	3,2	13,5	81,7	nd	nd	nd	nd	nd
72	2,7	6,4	nd	20,7	44,4	nd	nd	nd	nd
96	2,3	7,6	nd	0,3	55,6	nd	nd	nd	6,2

nd = não detectado

**Tabela D.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,8 g/L ácido acético.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,9	3,1	12,8	79,8	nd	2,8	nd	nd	nd
72	4,4	5,6	nd	30,1	15,5	4,0	nd	nd	8
96	4,2	5,2	nd	19,7	16,7	4,2	nd	nd	15

nd = não detectado

**Tabela D.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,6 g/L ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,4	3,1	12,7	79	nd	nd	0,6	nd	nd
72	3,2	6,3	nd	10,2	46,2	nd	0,6	nd	4,5
96	2,5	6,8	nd	Nd	49,2	nd	0,6	nd	9,7

nd = não detectado

**Tabela D.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 de ácido acético e 0,7 g/L ácido ferúlico.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,4	3,1	12,8	79,8	nd	2,6	0,7	nd	nd
72	4,5	6,0	nd	30,1	16,4	4,3	0,6	nd	5,5
96	4,2	5,6	nd	23,2	16,9	4,4	0,6	nd	13,4

nd = não detectado

**Tabela D.5.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,9	3,1	12,9	80,2	nd	nd	nd	0,8	nd
72	2,9	6,3	nd	1,0	66,5	nd	nd	0,8	3,6
96	2,2	7,3	nd	0	62,8	nd	nd	0,8	4,9

nd = não detectado

**Tabela D.6.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,6 g/L de ácido acético e 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,9	3,1	12,5	79,0	nd	2,6	nd	0,8	nd
72	3,8	6,9	nd	8,5	54,6	2,7	nd	0,8	7,6
96	3,7	8,1	nd	0	58,5	2,6	nd	0,8	7,5

nd = não detectado

**Tabela D.7.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 0,6 g/L de ácido ferúlico e 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,0	3,1	12,6	79,1	nd	nd	0,6	0,8	nd
72	3,6	6,5	nd	18,3	47,0	nd	0,6	0,8	8,4
96	3,6	5,9	nd	3,4	53,5	nd	0,6	0,8	9,0

nd = não detectado

**Tabela D.8.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 2,7 g/L de ácido acético; 0,7 g/L de ácido ferúlico e 0,8 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,66	3,16	12,2	78,9	nd	2,7	0,7	0,8	nd
72	4,81	6,56	nd	27,0	33,0	3,2	0,6	0,8	nd
96	4,82	5,96	nd	13,8	34,2	3,8	0,6	0,8	9,5

nd = não detectado

**Tabela D.9.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,6 g/L de ácido acético; 0,3 g/L de ácido ferúlico e 0,4 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,1	3,14	12,5	78,9	nd	1,6	0,3	0,5	nd
72	4,1	4,87	nd	32,3	23,0	3,5	0,3	0,4	8,2
96	3,8	5,55	nd	20,7	23,0	3,6	0,3	0,4	11,8

nd = não detectado

**Tabela D.10.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,7 g/L de ácido acético; 0,3 g/L de ácido ferúlico e 0,4 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,1	3,1	13,4	81,0	nd	1,7	0,3	0,4	nd
72	4,1	4	nd	33,8	22,6	3,4	0,3	0,4	8,7
96	3,8	5,5	nd	21,9	23,6	3,6	0,3	0,4	12,6

nd = não detectado

**Tabela D.11.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guillermondii* cultivada em meio definido suplementado com 1,7 g/L de ácido acético; 0,3 g/L de ácido ferúlico e 0,4 g/L siringaldeído.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,1	3,1	13,1	79,7	nd	1,7	0,3	0,4	nd
72	3,9	5,9	nd	31,2	24,7	3,6	0,4	0,4	8,6
96	3,8	5,5	nd	21,0	27,4	3,6	0,3	0,4	13,1

nd = não detectado

### APÊNDICE E. Resultado da Influência do Ácido Acético, Ácido Ferúlico e Siringaldeído sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol Empregando o Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz

Nesta seção nas tabelas a seguir estão mostrando os valores obtidos em todos os ensaios realizados com hidrolisado de palha de arroz, com o pH ajustado para 5,5. A concentração celular foi definida pelo método de peso seco, enquanto que a concentração de açúcares foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – WATERS), Foi também determinada o valor de pH por potenciometria

**Tabela E.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivado em hidrolisado com concentração de inibidores residuais após o processo de tratamento.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	3,2	11,5	86,7	nd	1,4	0,1	0,1	nd
72	5,6	9,2	nd	27,7	43,1	3,6	0,2	0,1	7,5
96	5,5	9,7	nd	10,8	47,7	3,9	0,4	0,1	8,2

nd = não detectado AA= ácido acético; AF= ácido ferúlico; SI = siringaldeído.

**Tabela E.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivado em hidrolisado com concentração de inibidores residuais após o processo de tratamento.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	3,2	11,6	84,5	nd	1,4	0,1	0,1	nd
72	5,2	9,5	nd	22,9	43,4	3,3	0,1	0,1	7,7
96	5,5	10,0	nd	13,2	46,5	3,5	0,1	0,2	9,0

nd = não detectado AA= ácido acético; AF= ácido ferúlico; SI = siringaldeído

**Tabela E.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivado em hidrolisado com níveis ajustados para o máximo dos inibidores estudados (2,2 g/L de ácido acético, 0,6 g/L de ácido ferúlico e 0,7 g/L de siringaldeído).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	3,2	12,2	80,4	nd	2,2	0,6	0,7	nd
72	5,2	6,9	nd	21,3	30,0	3,8	0,6	0,8	10,1
96	5,0	7,4	nd	16,5	32,4	3,5	0,6	0,8	10,3

nd = não detectado AA= ácido acético; AF= ácido ferúlico; SI = siringaldeído

**Tabela E.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivado em hidrolisado, com níveis ajustados para o máximo dos inibidores estudados (2,3 g/L de ácido acético, 0,6 g/L de ácido ferúlico e 0,8 g/L de siringaldeído).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	SI (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,5	3,2	12,1	79,4	nd	2,3	0,6	0,8	nd
72	5,1	6,4	nd	25,3	30,1	3,4	0,6	0,8	9,9
96	5,0	6,9	nd	18,2	31,1	3,6	0,6	0,8	10,1

nd = não detectado AA= ácido acético; AF= ácido ferúlico; SI = siringaldeído